

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Microbiología y Parasitología



TESIS DOCTORAL

**Genes implicados en la variabilidad antigénica, la resistencia
a antimicrobianos y la virulencia en "Streptococcus
pyogenes" en España (1994-2006)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Virginia Rubio López

DIRECTOR:

Juan Antonio, dir Sáez Nieto

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y

PARASITOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**Genes implicados en la variabilidad antigénica, la
resistencia a antimicrobianos y la virulencia en
Streptococcus pyogenes en España (1994-2006).**



VIRGINIA RUBIO LÓPEZ

MADRID, 2009

39566493

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a Juan Antonio Sáez Nieto la oportunidad de realizar esta tesis en el Instituto de Salud Carlos III bajo su dirección. Me he sentido privilegiada desde el primer momento en el que comencé a formar parte de su equipo, en el Laboratorio de Taxonomía, para mí ha sido muy importante tanto en el desarrollo laboral como personal. Gracias Juan por compartir tus conocimientos conmigo y aconsejarme en muchos momentos laborales y personales, me has enseñado muchas cosas. Gracias por hacer el esfuerzo de entenderme en los últimos momentos de escritura de esta tesis.

Otra persona muy especial es Sylvia Valdezate, no tengo palabras para agradecerla todo lo que ha hecho por mí. Siempre me ha aconsejado y orientado, dispuesta a ayudarme en cualquier momento. Gracias por darme tu opinión y esforzarte tanto para ayudarme con esta tesis.

No me puedo olvidar de David Álvarez que me enseñó muchas de las técnicas que he desarrollado en el laboratorio y a la cual guardo mucho cariño. Por supuesto a mi amiga y compañera Ana Navarro, importante en todos los aspectos, sin la cual mi estancia en el laboratorio no hubiera sido la misma. A M^a Jose y Pilar, dispuestas a ayudar y escuchar en cualquier momento, gracias Pilar por soportarme en el laboratorio estos últimos meses, creo que no podría haber encontrado mejores compañeras, me alegra enormemente haber trabajado con vosotras.

Gracias a Conchi, que me ha soportado este último año y me ha ayudado a terminar parte de esta tesis. También quiero dar las gracias a Marta y nuestra última incorporación, Gema. Por supuesto no me puedo olvidar de Noe que junto con Anita dieron mucha alegría al laboratorio.

Gracias a todas las personas del Servicio de Bacteriología a las cual me da miedo nombrar por temor a olvidarme de alguna de ellas. Gracias por permitirme usar sus aparatos, por ayudarme con dudas, por prestarme un programa informático, por contar conmigo para asistencias a congresos (agradecer a Silvia y a sus amigos la estancia en Atlanta), por prestarme un documento, por pelearos conmigo con el ordenador..... en fin mil gracias a todos los que en algún momento me habéis echado una mano.

Gracias al servicio de secuenciación. A las personas con las que compartí mis primeros desayunos, fueron impresionantes, Merche, Raquel, Sonia, Rubén, Marga, Cristina y Virgi. A mis compañeras del doctorado Carol, Montse, Ana y Alejandra. A

M^a Eugenia Llana que estuvo de estancia en nuestro laboratorio en los comienzos de esta tesis y me proporcionó ayuda con la parte de antibióticos. Por supuesto a mis amigas y amigos que siempre me apoyan y ayudan en todo lo que hago, no tengo palabras para vosotros, sois geniales. A mis amigos los biólogos, con los que he compartido tantos momentos dentro y fuera de la facultad. Y finalmente a toda mi familia, especialmente a mis padres y hermanos.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. TAXONOMÍA DEL GÉNERO <i>Streptococcus</i>	1
1.1. Estreptococos β -hemolíticos	2
2. <i>Streptococcus pyogenes</i>	5
2.1. Principales antígenos de <i>S. pyogenes</i>	5
2.1.1. Grupo de Lancefield	5
2.1.2. Proteína M	6
2.1.2.1. Estructura de la proteína M	7
2.1.2.2. Clasificación de la proteína M	10
2.1.2.3. Identificación de la proteína M y el gen <i>emm</i>	10
2.1.3. La proteína T	11
2.1.4. El factor de opacidad (SOF)	16
2.2. Productos extracelulares de <i>S. pyogenes</i>	16
2.3. Exotoxinas pirogénicas estreptocócicas (SPE)	17
2.3.1. Principales características de SPE _s	17
2.3.2. Efectos en el huésped	20
2.3.3. Superantígenos descritos en <i>S. pyogenes</i>	20
2.3.3.1. Exotoxinas pirogénicas A y C (<i>speA</i> y <i>speC</i>)	22
2.3.3.2. Exotoxina mitogénica Z (<i>smeZ</i>)	23
2.3.3.3. Superantígeno estreptocócico (<i>ssa</i>)	23
2.3.3.4. Exotoxina pirogénica J (<i>speJ</i>)	24
2.3.3.5. Exotoxinas pirogénicas H e I (<i>speH</i> y <i>speI</i>)	24
2.3.3.6. La cisteína proteasa (<i>speB</i>) y el factor mitogénico (<i>speF</i>)	24
2.3.3.7. Exotoxinas pirogénicas <i>speK/L</i> , <i>speL/M</i> y <i>speM</i>	26
2.3.4. Exotoxinas y su relación con diversos cuadros clínicos	26
3. INFECCIONES PRODUCIDAS POR SGA	27
3.1. Infecciones superficiales	30
3.1.1. Faringitis	30
3.1.2. Infecciones cutáneas	30
3.2. Infecciones invasivas	31
3.2.1. Celulitis	31

3.2.2. Fascitis necrotizante	33
3.2.3. Bacteriemia	33
3.2.4. Sepsis puerperal	34
3.3. Infecciones mediadas por toxinas	34
3.3.1. Síndrome de shock tóxico estreptocócico (STSS)	34
3.3.2. Escarlatina	35
3.4. Infecciones mediadas inmunológicamente	35
3.4.1. Fiebre reumática	35
3.4.2. Glomerulonefritis post-estreptocócica	37
4. EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR <i>S. pyogenes</i>	37
4.1. Mecanismo de transmisión	37
4.2. Estado de portador	38
4.3. Factores de riesgo e incidencia de la infección	39
4.4. Aspectos epidemiológicos	39
4.4.1. Distribución mundial de la infección por SGA	42
4.4.2. Distribución de la infección en España	44
4.5. Vacuna frente a SGA	44
5. SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS	47
5.1. Resistencia a macrólidos	47
5.1.1. Clasificación y estructura química	47
5.1.2. Espectro antimicrobiano	48
5.1.3. Mecanismo de acción y resistencias	49
5.1.3.1. Modificación del lugar de unión	50
5.1.3.2. Bomba de expulsión activa	53
5.1.3.3. Enzimas inactivantes	54
5.1.4. Epidemiología de la resistencia a macrólidos	55
5.2. Resistencia a tetraciclinas	57
5.2.1. Clasificación y estructura química	57
5.2.2. Espectro antimicrobiano	57
5.2.3. Mecanismo de acción y resistencia	58
5.2.3.1. Proteínas de protección ribosomal	59
5.2.3.2. Bombas de expulsión activa	60
5.2.3.3. Genes de resistencia a tetraciclina y su asociación con elementos móviles	60

5.2.4. Epidemiología de la resistencia a tetraciclina	61
OBJETIVOS	63
MATERIAL Y MÉTODOS	
1. ORIGEN DE LAS CEPAS	65
2. IDENTIFICACIÓN DE SGA	68
2.1. Método de aglutinación en látex	69
2.2. Pruebas miniaturizadas	70
2.2.1. La galería bioquímica rapid ID 32 STREP	70
2.2.2. Paneles de identificación de Gram positivos	71
3. TIPIFICACIÓN DEL ANTÍGENO T	72
4. TIPIFICACIÓN GEN <i>emm</i> (Proteína M)	73
4.1. Extracción del ADN bacteriano con cloroformo	73
4.2. Amplificación del gen <i>emm</i>	73
4.3. Purificación y secuenciación del gen <i>emm</i>	75
4.4. Análisis de los datos	77
5. ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO (PFGE)	78
5.1. Obtención del ADN cromosómico y lisis bacteriana	78
5.2. Digestión del ADN bacteriano y electroforesis	79
5.2.1. <i>Sma</i> I-PFGE	79
5.2.2. <i>Sfi</i> I-PFGE	80
5.2.3. Tinción y captura de la imagen	80
5.3. Análisis de los perfiles electroforéticos	80
5.3.1. Relación filogenética	80
5.3.2. Índice de discriminación de Simpson	81
6. DETECCIÓN DE GENES CODIFICANTES DE TOXINAS	82
7. SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS	86
8. CARACTERIZACIÓN DE CEPAS RESISTENTES A MACRÓLIDOS	87
8.1. Caracterización fenotípica de cepas resistentes a macrólidos	87
8.2. Detección de genes de resistencia a macrólidos	88
9. DETECCIÓN GENES DE RESISTENCIA A TETRACICLINA	91

10. DETECCIÓN GENES DE RESISTENCIA A RIFAMPICINA	91
10.1. Extracción del ADN bacteriano con cloroformo	92
10.2. Amplificación del gen <i>rpoB</i>	92
10.3. Purificación y secuenciación del gen <i>rpoB</i>	93
10.4. Análisis de las secuencias obtenidas	93

RESULTADOS

1. IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS	94
2. VARIABILIDAD ANTIGÉNICA DE <i>S. pyogenes</i>	94
2.1. Tipos T	94
2.2. Tipos M (gen <i>emm</i>)	95
2.3. Fórmula antigénica de SGA	96
3. FÓRMULA ANTIGÉNICA Y CUADRO CLÍNICO	98
4. ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO DE CEPAS DE SGA	100
4.1. Análisis mediante <i>Sma</i> I-PFGE	100
4.1.1. Correlación <i>Sma</i> I-PFGE y fórmula antigénica	105
4.2. Análisis de las cepas no digeribles con <i>Sma</i> I	108
4.3. Análisis mediante <i>Sfi</i> II-PFGE	109
5. ESTUDIO DE BROTES	112
6. GENES DE TOXINAS ERITROGÉNICAS	114
6.1. Análisis de genes toxigénicos	114
6.1.1. Correlación genes toxigénicos y cuadro clínico	117
6.1.2. Correlación genes toxigénicos y fórmula antigénica	118
6.2. Análisis de la fórmula toxigénica	121
6.2.1. Correlación fórmula toxigénica y cuadro clínico	123
6.2.2. Correlación fórmula toxigénica y antigénica	130
7. SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS	133
7.1. Análisis de la resistencia a macrólidos y clindamicina	133

7.1.1. Correlación fórmula antigénica, cuadro clínico y resistencia a macrólidos	134
7.1.2. Fenotipos de resistencia a macrólidos	136
7.1.3. Genes de resistencia a macrólidos	137
7.1.4. Análisis SGA resistentes a eritromicina mediante PFGE	139
7.2. Resistencia a tetraciclina	142
7.2.1. Fórmula antigénica, cuadro clínico y resistencia a tetraciclina	142
7.2.2. Genes de resistencia a tetraciclina	144
7.2.3. PFGE de cepas resistentes a tetraciclina	145
7.3. Resistencia conjunta a eritromicina y tetraciclina	146
7.3.1. Fórmula antigénica, cuadro clínico y resistencia	146
7.3.2. Genes de resistencia conjunta a eritromicina y tetraciclina	148
7.3.3. PFGE de cepas resistentes a eritromicina y tetraciclina	149
7.4. Análisis mediante <i>Sma</i> -PFGE de cepas resistentes a eritromicina y/o tetraciclina	149
7.5. Análisis resistencia a rifampicina	151
7. COBERTURA VACUNAL	152

DISCUSIÓN

1. Características antigénicas de las cepas de <i>S. pyogenes</i> circulantes en España entre 1994-2006	153
2. Control de la infección. Cobertura vacunal en nuestro medio, en función de los tipos T y <i>emm</i> predominantes en España	158
3. Distribución de los tipos antigénicos en los cuadros clínicos producidos por SGA	159
4. Estudio de la clonalidad de las cepas de SGA y su correlación con su combinación antigénica	162
5. Estudio del perfil de 10 genes de toxinas implicados en la virulencia y análisis de su relación con los serotipos y cuadros clínicos más graves	164
6. Sensibilidad de las cepas a los antibióticos empleados en el tratamiento de las infecciones producidas por SGA	170
7. Resistencia a macrólidos	172

8. Caracterización fenotípica y molecular de los mecanismos de resistencia a macrólidos	174
9. Resistencia a tetraciclina	177
10. Caracterización molecular de los mecanismos de resistencia a tetraciclina	178
11. Resistencia conjunta a eritromicina y tetraciclina	179
12. Resistencia a rifampicina	181
<u>CONCLUSIONES</u>	183
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	187

INTRODUCCIÓN

1. TAXONOMÍA DEL GÉNERO *Streptococcus*

Durante los últimos 20 años la taxonomía del género *Streptococcus* ha sufrido numerosas modificaciones debido al avance de las técnicas moleculares. Técnicas como la hibridación ADN-ADN y secuenciación del gen que codifica el ARN ribosómico 16S (16S ADNr) han permitido delimitar diferencias entre géneros y especies bacterianas ya existentes (Facklam, 2002a).

Inicialmente, en 1903 Shottmuller diferenció cepas del género *Streptococcus* en función de la capacidad para producir hemólisis en los medios de cultivo de agar sangre (Figura 1). Rebecca Lancefield en 1933, clasificó las cepas β -hemolíticas en serogrupos (grupos Lancefield) basándose en las diferencias antigénicas de los hidratos de carbono de la pared celular de *Streptococcus*, analizadas mediante técnicas de precipitación capilar.

En 1937 Sherman propuso la división del género *Streptococcus* en cuatro grupos, en función de la capacidad de hemólisis, el serogrupo y el análisis fenotípico: división piogénica, viridans, láctica y enterococos.

División piogénica: Constituida por los estreptococos β -hemolíticos y los grupos de Lancefield A, B, C, E, F y G. Esta división no difiere de la actual.

División viridans: Constituida por estreptococos con hemólisis α y γ . No crecen a 10°C y no toleran valores elevados de pH ni cloruro sódico. Esta división se corresponde con el actual grupo viridans formado por un número mayor de especies.

División láctica : Reclasificada en 1980 como género *Lactococcus*.

División de enterococos: Poseen capacidad para crecer en medios con pH_s elevados y concentraciones altas de cloruro sódico, así como un amplio rango de temperatura de crecimiento 10-45°C. Actualmente denominado género *Enterococcus* (Facklam, 2002a).

Las características fisiológicas como son el tamaño de la colonia, la hemólisis y el serogrupo no son suficientes para la identificación de los estreptococos. Por todo ello, una de las herramientas más aplicadas para la revisión del sistema de clasificación del género *Streptococcus* ha sido la secuenciación del gen 16S ADNr (Facklam, 2002a).

En la actualidad mediante la taxonomía polifásica (fenotípica y molecular) se han descrito hasta 75 especies del género *Streptococcus* (J.P.Euzeby: List of Prokariotic names with standing in nomenclature).

1.1. Estreptococos β -hemolíticos

Se denominan estreptococos β -hemolíticos a las especies que son capaces de hemolizar totalmente la sangre incluida en los medios de cultivo (Figura 1). Actualmente integran este grupo 12 especies (Facklam, 2002a). Estos estreptococos se clasifican en función del grupo de Lancefield como se muestra en la Figura 1.



Figura 1. En el lado izquierdo de la imagen se muestra la β -hemólisis en agar sangre de un estreptococo. En la derecha se observa la diferencia entre un estreptococo β -hemolítico (hemólisis total), α -hemolítico (hemólisis parcial) y γ -hemolítico (no hemolítico).

Tabla 1. Especies descritas de estreptococos β -hemolíticos, grupos de Lancefield que presentan y principales orígenes (Facklam, 2002a).

Especies	Grupo de Lancefield	Bacitracina	Origen
<i>S. pyogenes</i>	A	+	Humano
<i>S. agalactiae</i>	B	-	Humano, bovino
<i>S. dysgalactiae</i>			
subsp. <i>dysgalactiae</i> ^a	C	-	Animal
subsp. <i>equisimilis</i>	A, C, G y L	-	Humano, animal
<i>S. equi</i>			
subsp. <i>equi</i>	C	-	Animal
subsp. <i>zooepidemicus</i>	C	-	Animal, humano
<i>S. canis</i>	G	-	Canino, humano
<i>S. anginosus</i> (grupo) ^b	A, C, G, F, ninguno	-	Humano
<i>S. constellatus</i>	C	-	Humano
subsp. <i>pharyngis</i>			
<i>S. porcinus</i>	E, P, U, V, ninguno, nuevo	-	Porcino, Humano
<i>S. iniae</i>	ninguno	-	Delfin, pez, humano
<i>S. phocae</i>	C y F	+	Foca
<i>S. didelphis</i>	ninguno	-	Zarigüeya

^a*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* no es β -hemolítico pero está incluido por razones taxonómicas.

^b El grupo *anginosus* incluye tres especies: *S. anginosus*, *S. constellatus* y *S. intermedius*.

+: sensible a bacitracina; -: resistente a bacitracina.

Grupo A: *S. pyogenes* es la única especie que posee este grupo. Se considera una de las bacterias más patógenas del género *Streptococcus*. Produce una amplia variedad de cuadros clínicos, desde faringitis hasta distintos tipos de enfermedades invasivas graves (Facklam, 2002a).

Grupo B: Este grupo se presenta en *S. agalactiae*, cuyo principal reservorio es el tracto gastrointestinal distal de humanos. En mujeres es frecuente la colonización vaginal, situando a este patógeno como el principal causante de sepsis neonatal. Además de en recién nacidos, causa infecciones en embarazadas y adultos con enfermedades de base (diabetes, cáncer y VIH).

En adultos puede producir diversas enfermedades como: bacteriemia, endocarditis, infecciones de piel y tejidos blandos, neumonía y osteomielitis (Facklam, 2002a; Ruof, 2003).

Grupos C y G: Las especies que presentan estos grupos de Lancefield (Tabla 1) han sido consideradas durante muchos años patógenos animales. A partir de 1980 aparecen las primeras descripciones de casos de infecciones en humanos y comienzan a ser consideradas como posibles patógenos humanos (Efstratiou, 2000).

Los principales reservorios de los grupos C y G de Lancefield son los animales, aunque también forman parte de la flora humana. Las infecciones humanas producidas por estos microorganismos son poco frecuentes, pero el origen de la infección suele estar asociado con el contacto con animales domésticos o la ingestión de alimentos como lácteos y derivados (Bordes-Benitez, 2006; Efstratiou, 1997; Kuusi, 2006).

2. *Streptococcus pyogenes*

S. pyogenes es un estreptococo β -hemolítico que pertenece al grupo A de Lancefield (SGA). Es considerada una de las bacterias patógenas más importantes en humanos (Facklam, 2002a).

SGA es un coco gram positivo con forma esférica u ovoide de diámetro 0,6-1 μm que se agrupa en parejas o cadenas. El microorganismo es inmóvil, no forma esporas, catalasa negativo, oxidasa negativo, sensible a bacitracina y anaerobio facultativo (Bisno, 2005a). Crece en un medio suplementado con agar sangre ovina, formando colonias de color blanquecino a grisáceo rodeadas por una zona de completa hemólisis (β -hemólisis). El tamaño de las colonias suele ser de 1-2 mm de diámetro y en ocasiones pueden presentar aspecto mucoso.

Como identificación presuntiva de SGA se utiliza la sensibilidad a bacitracina y la actividad pirrolidónil aminopeptidasa (enzima producida por *S. pyogenes* pero no por otros estreptococos β -hemolíticos) siendo *S. pyogenes* el único estreptococo β -hemolítico positivo a ambas pruebas (Facklam, 2002a; Ruoff, 2003).

No obstante, cabe mencionar que esta uniformidad del grupo A de Lancefield frente a la susceptibilidad a bacitracina se ha modificado en los últimos años, apareciendo en España y otros países cepas resistentes a este antibiótico (Perez-Trallero, 2004), por lo que esta prueba no debe considerarse excluyente.

2.1. Principales antígenos de *S. pyogenes*

2.1.1. Grupo de Lancefield

El grupo de Lancefield descrito por esta autora en 1933, lo determina el tipo de polisacárido presente en la pared celular de los estreptococos. Estos polisacáridos poseen diferencias inmunológicas que permiten clasificar a los estreptococos en diferentes grupos: A, B, C, D, F y G, entre otros. *Streptococcus pyogenes* posee el

hidrato de carbono específico del grupo A compuesto por N-acetil- β -D-glucosamina unido a un esqueleto de ramnosa (Figura 2).

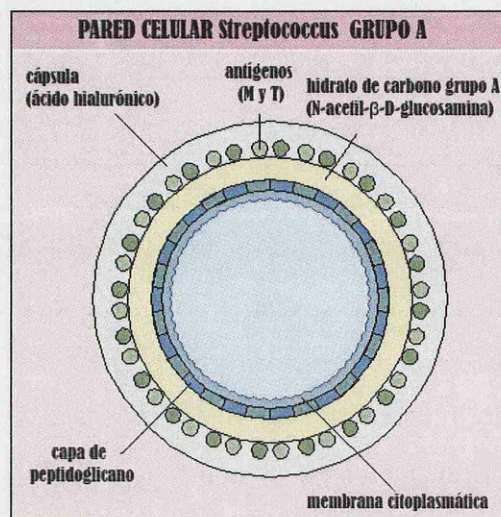


Figura 2. Estructura de la pared celular del estreptococo del grupo A y sus principales antígenos.

La detección se realiza mediante métodos serológicos (técnica de precipitación por capilaridad) con antisueros tipo específicos frente a estos antígenos (Cunningham, 2000).

2.1.2. Proteína M

La proteína M es el mayor factor de virulencia de SGA, se ancla a la membrana celular y presenta variación antigénica. Esta característica se utiliza para dividir a *S. pyogenes* en diferentes serotipos (Fischetti, 1989).

Este antígeno de superficie permite que SGA evite la fagocitosis y sobreviva en el huésped (Facklam, 2002a). La proteína M impide la fagocitosis del estreptococo mediante la unión selectiva al factor H (proteína control del complemento) y al fibrinógeno inactivando la cascada del complemento (Cunningham, 2000; Musser, 1997).

2.1.2.1. Estructura de la proteína M

La proteína M es un dímero estable de 50-60 nm de longitud, constituido por dos cadenas de hélice alfa enrolladas sobre si mismas en espiral, a modo de cuerda y unidas a la membrana celular por el extremo carboxilo terminal (Efstratiou, 2000; Fischetti, 1989). La estructura primaria de la proteína está constituida por repeticiones en tándem de siete aminoácidos (a-b-c-d-e-f-g). Los residuos en posiciones a y d son hidrofóbicos mientras que el resto de los residuos permiten el giro de la proteína sobre sí misma, a modo de espiral, adoptando la configuración en hélice alfa. La molécula M se ha dividido en 4 regiones distintas en función de la secuencia de aminoácidos que se repite. En el extremo amino se encuentra el bloque A mientras que en el carboxilo el bloque D. En la Figura 3 se muestra la estructura primaria de la proteína (Fischetti, 1989).

La proteína M presenta un tamaño variable (41-80 kDa) en función del número de repeticiones de aminoácidos de los bloques A y B (Cunningham, 2000).

Como se ha mencionado anteriormente, el extremo carboxilo de la proteína M se encuentra unido a la membrana celular mientras que la región N- terminal se extiende hacia fuera de la pared del estreptococo (Figura 4). El extremo carboxilo está bastante conservado ya que las diferentes proteínas M de *S. pyogenes* comparten una homología de más de un 98%. Sin embargo, el extremo amino terminal es una región hipervariable característica de cada serotipo M. Esta región N-terminal está constituida por una secuencia no helicoidal de 11 aminoácidos y el bloque de repeticiones A.

El segmento amino terminal juega un papel importante en la actividad biológica de la molécula, ya que el sistema inmune produce anticuerpos frente a esta región hipervariable facilitando la fagocitosis del estreptococo. Este hecho implica que los anticuerpos producidos ante una infección estreptocócica son específicos del serotipo, y no van a proteger al hospedador ante futuras infecciones estreptocócicas causadas por diferentes serotipos M (Fischetti, 1989). Esto supone un problema a la hora de desarrollar una vacuna contra esta región, ya que sólo protegen contra un tipo de estreptococo en particular (Fischetti, 1989).



-8-

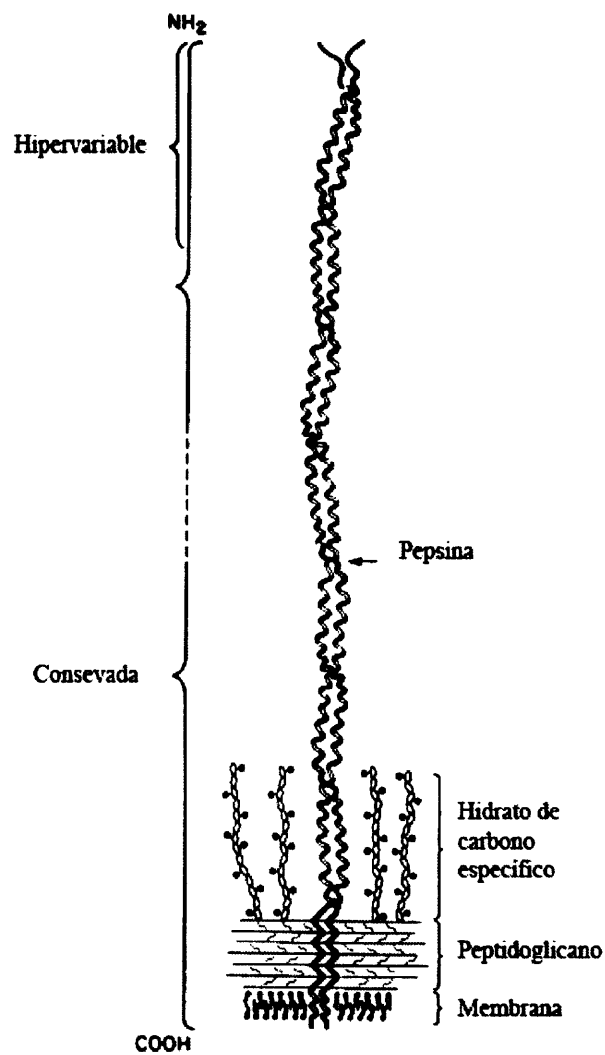


Figura 4. Modelo propuesto para la proteína M6 basado en la secuencia y datos estructurales. La región rica en prolina y glicina está localizada dentro del peptidoglicano. Se indican las diferentes regiones que contienen los epítomos conservados, variables e hipervariables en los serotipos M heterólogos.

2.1.2.2. Clasificación de la proteína M

Las proteínas M han sido divididas en clase I y clase II, esta división está basada en su reacción con los anticuerpos frente a la región de repetición C. Las proteínas de clase I contienen un epítipo expuesto a la superficie en todos los estreptococos que reacciona con los anticuerpos frente a la región de repetición C mientras que las proteínas de clase II no contienen este epítipo y no reaccionan ante estos anticuerpos. Además los serotipos de proteínas de clase I presentan un factor de opacidad negativo mientras que las de clase II son factor de opacidad positivo (Cunningham, 2000).

2.1.2.3. Identificación de la proteína M y el gen *emm*

La proteína M comenzó a identificarse serológicamente mediante una prueba de precipitación capilar, originalmente introducida por Lancefield, en la que se usaban antiseros tipo-específicos. La producción de estos antiseros tipo-específicos M se realiza en algunos laboratorios internacionales de referencia, debido a que su producción es costosa y laboriosa.

El desarrollo de las técnicas moleculares ha permitido secuenciar el gen *emm* que codifica la proteína M y actualmente es el método más utilizado en los laboratorios para la identificación del serotipo M.

La secuenciación del gen *emm* permite la genotipificación de la mayoría de aislamientos no serotipables (Efstratiou, 2000; Facklam, 1999). Este método consiste en la secuenciación de 160 pb a 660 pb de la región terminal 5' del gen *emm*. Esta región es altamente heterogénea y codifica para la especificidad de serotipo, considerándose que dos aislados comparten el mismo serotipo si su identidad es $\geq 95\%$ para las primeras 160 pb del extremo 5' (Facklam, 1999). En un mismo serotipo se pueden observar leves alteraciones en su secuencia, permitiendo una clasificación en subtipos. La información de estos subtipos permite incrementar la especificidad de la información epidemiológica (Li, 2003).

Hasta el momento se han descrito 124 secuencias del gen *emm* (Facklam, 2002b) en la base de datos del Centers for Disease Control and Prevention (CDC) en Atlanta (ftp://ftp.cdc.gov/pub/infectious_diseases/biotech/tsemm/) y 832 secuencias si se

consideran los diferentes alelos encontrados para cada serotipo. Este número continúa aumentando a medida que se identifican secuencias nuevas.

En un principio una secuencia nueva es designada como secuencia tipo (ST) hasta que es confirmada y numerada como *emm* mediante consenso de los diferentes Laboratorios de Referencia de Estreptococos (Facklam, 1999). En la base de datos del CDC (agosto 2009) hay 104 secuencias tipo pendientes de asignar como nuevos genes *emm*.

Esta diversidad de secuencias *emm* se debe a amplias repeticiones a nivel del ADN que se traducen en diferentes tamaños de proteínas M (Cunningham, 2000).

2.1.3. La proteína T

La proteína T es otro antígeno de la pared celular presente en SGA y otros estreptococos, excepto en los grupos C y G (Cunningham, 2000). Es una proteína de función desconocida que constituye la base de los ensayos de aglutinación por serología, se han identificado 25 serotipos T diferentes (Cunningham, 2000; Jones, 1991).

El tipado de la proteína T es importante en la investigación epidemiológica de los aislados de *S. pyogenes*. Determinados tipos M y *emm* se asocian con determinados tipos T. Por otro lado, cepas con una misma secuencia *emm* presentan marcadas diferencias en los serotipos T, hecho que se correlaciona con diferentes tipos clonales que podrían tener importancia en la patogenicidad de SGA (Johnson, 2006). Las correlaciones descritas entre la proteína M, gen *emm* y la proteína T se muestra en la tabla 2.

La correlación entre la proteína T y la secuencia del gen *emm* permite el estudio de la diversidad de las cepas de SGA (Cunningham, 2000).

Tabla 2. Correlación entre los tipos M/*emm*, SOF/*sof* y T para aislados de SGA.

La columna “ tipo M ” indica los serotipos oficialmente confirmados como proteína tipo M, incluye desde el tipo M1-93. La columna “ tipo *emm* ” indica las secuencias del gen *emm* oficialmente confirmadas. La columna “ patrón de aglutinación ” indica los tipos T observados para cada tipo M/*emm* , entre paréntesis aparece el número de aislados con este patrón T. En los casos en los que múltiples patrones T se encuentran dentro de un mismo tipo M/*emm*, los patrones considerados como claramente distintos están separados por punto y coma. Los patrones relacionados se separan por barras inclinadas, seguidos por el número acumulativo de aislados con estos patrones. Los patrones T que no poseen ningún número entre paréntesis indican una observación individual o un número pequeño de observaciones. NT indica proteína T no tipable mediante serología; Misc (miscelánea) indica patrones T incompletamente identificados o confirmados. Los patrones T obtenidos con cepas de referencia para cada tipo M y *emm* se indican en negrita y subrayados.

Abreviaturas: NA, no aplicable; N, negativo; P, positivo; ND, no realizado. “ — ” se usa en la columna n° de aislados, para tipos M previamente designados y que presentan la misma secuencia *emm* (27L/77, 38/40,44/61, 50/62 y 65/69).

Tipo M	Tipo <i>emm</i>	SOF	Gen <i>sof</i>	n° de aislados	Patrón de aglutinación T
1	1	N	N	4107	<u>1</u> (3,979); NT (110); 1/3/13/B3264 (18)
2	2	P	P	742	<u>2</u> (528); 2/28 (146); 8/25/ <u>Imp19</u> (56); NT (12)
3	3	N	N	2171	<u>3/13/B3264</u> (1,959); NT (202); 1 (10)
4	4	P	P	1543	<u>4</u> (1,478); NT (30); 8/25/ <u>Imp19</u> (16); 4/28 (14); 3/13 (5)
5	5	N	N	616	<u>5/27/44</u> (442); NT (166); 11/12 (8)
6	6	N	N	1412	<u>6</u> (1,283); NT (129)
7	NA	NA	NA	0	M-7 no existe. Estreptococo del grupo C.
8	8	P	P	18	<u>8/25/Imp19</u> (15); T14 (2); NT (1)
9	9	P	P	142	<u>9</u> (97); 14 (20); 5/9 (17); 9/3/B3264 (3); NT (4); 11/12
10	NA	NA	NA	0	M-10 no existe. Igual que M-12.
11	11	P	P	339	<u>11</u> , 11/12 (311); NT (26); 28 (2)
12	12	N	P	2585	<u>12</u> , 11/12 (2,396); NT (189)
13	13	P	P	4	<u>3/13/B3264</u> (4)
14	14	N	N	13	<u>14</u> (6); NT (5); 11 (2)
15	15	N	N	4	3/13/B3264 (3); 8/25 (1); <u>23</u> , <u>23/8/14</u>
16	NA	NA	NA	0	M-16 no existe. Pertenece al grupo G de estreptococos.
17	17	N	ND	0	<u>23</u> , 23/8/14
18	18	N	N	456	<u>18</u> (127); NT (192); 8/ <u>Imp19</u> /27 (125); 14 (7); 8/25, 5/27/44, <u>23</u> (5); <u>9/18</u>
19	19	N	N	9	23 (7); <u>NT</u> (2); <u>9/18</u>
20	NA	NA	NA	0	M-20 no existe. Grupo C de estreptococos.
21	NA	NA	NA	0	M-21 no existe. Grupo C de estreptococos.
22	22	P	P	681	12 (391); 12/3/13/B3264, 13/B3264 (219); 11/12 (50); NT (17); <u>22</u> (4)

Tipo M	Tipo emm	SOF	Gen sof	n° de aislados	Patrón de aglutinación T
23	23	N	ND	2	<u>23</u> , NT
24	24	N	ND	6	<u>4</u> (4); NT (2)
25	25	P	P	38	<u>8/25/Imp19</u> (20); NT (9); 1 (5); 14 (3); 11/12
26	26	N	ND	4	<u>NT</u> (4)
27G	27G	P	P	26	<u>5/27/44</u> (26); NT
27L	27L/77	P	P	-	<u>5/27/44</u> (ver emm-77)
28	28	P	P	1412	<u>28</u> , <u>4/28</u> (1,329); NT (35); 11/28, 12/28, 8/28 (37); 3/13/B3264 (9); 4
29	29	N	N	22	<u>28</u> , <u>4/28</u> (13); <u>NT</u> (9)
30	30	N	N	2	<u>23</u> , <u>NT</u>
31	31	N	N	28	<u>8/25/Imp19</u> (14); <u>NT</u> (14)
32	32	N	N	9	9 (7); <u>NT</u> (2); <u>8/14/23</u>
33	33	N	N	72	<u>3/13/B3264</u> (60); NT (8); 8/25 (4)
34	34	N	N	2	<u>28</u> , <u>3/13/28</u> , NT
35	NA	NA	NA	0	M-35 no existe. Igual que M-49
36	36	N	N	3	<u>NT</u> , 8/12
37	37	N	N	0	<u>NT</u>
38	38/40	N	N	-	<u>NT</u> (ver emm-40)
39	39	N	N	6	<u>3/13/B3264</u> (6); <u>NT</u>
40	38/40	N	N	1	<u>NT</u> (ver emm-38)
41	41	N	N	95	<u>3/13/B3264</u> (78); <u>NT</u> (17); Misc (4)
42	42	N	N	6	<u>3/13/B3264</u> (6)
43	43	N	N	88	<u>3/13/B3264</u> (68); NT (18); Misc (2)
44	44/61	P	P	-	<u>5/27/44</u> (ver emm-61)
45	NA	NA	NA	0	M-45 no existe. Igual que M-24
46	46	N	N	1	<u>4</u> ; 9
47	47	N	N	0	<u>23</u>
48	48	P	P	42	<u>4/28</u> (36); NT (6); Misc (3)
49	49	P	P	185	<u>14</u> (98); NT (56); <u>8/14/25/Imp19</u> (18); <u>3/13/B3264</u> (9); 12; Misc (3)
50	50/62	N	ND	-	<u>NT</u> (ver emm-62)
51	51	N	N	0	<u>14</u>
52	52	N	N	20	<u>3/13/B3264</u> (15); 14; <u>8/25/Imp19</u>
53	53	N	N	59	<u>3/13/B3264</u> (39); <u>NT</u> (7); 1 (3); Misc (10)
54	54	N	N	7	<u>28</u> (3); <u>3/13/B3264</u> (2); <u>NT</u> (2); <u>23</u>
55	55	N	N	8	<u>8/25/Imp19</u> (5); NT (3)
56	56	N	N	15	<u>NT</u> (9); <u>3/13/B3264</u> (2); <u>3/13/28</u> (4)
57	57	N	N	7	<u>NT</u> (5); <u>8/25</u> ; 3
58	58	P	P	158	<u>8/25/Imp19</u> (81); NT (45); <u>2/28</u> (18); <u>2/8/25</u> (11); 12 (2); <u>14/25</u>
59	59	P	P	41	<u>11/12</u> (27); NT (11); 14 (2); Misc (1); <u>14/25/Imp19</u>
60	60	P	P	26	<u>4</u> (16); <u>4/28</u> (6); NT (4)
61	44/61	P	P	198	<u>5/27/44</u> (146); <u>11/12</u> (24); NT (21); <u>8/25/Imp19</u> (7) <u>11</u> , <u>9/11</u> (ver emm-44)

Tipo M	Tipo emm	SOF	Gen sof	n° de aislados	Patrón de aglutinación T
62	50/62	P	P	18	<u>12</u> , 12/B3264 (15); 11/12 (3) (ver emm-50)
63	63	P	P	22	<u>4</u> (9); 6 (8); NT (4); Misc (1)
64	64	N	N	11	NT (5); 3, 3/13/28 (4); 14; 11/12; <u>8/14</u>
65	65/69	N	N	—	<u>8/25/Imp19</u> (ver emm-69)
66	66	P	P	44	12/13/B3264 (24); <u>12</u> , 11/12 (19); 4
67	67	N	N	3	B3264, 3/13; NT; <u>3/13/28</u> , <u>28</u>
68	68	P	P	34	3/13/B3264 (16); 12, 11/12 (5); <u>1</u> (6); 6 (3); 4 (2); NT (2)
69	65/69	N	N	9	8/25/Imp19, 2/25 (3); <u>3/13/B3264</u> (3); NT (3) (ver emm-65)
70	70	N	N	2	<u>28</u> ; 3/13
71	71	N	N	14	14 (6); NT (5); 3/13, <u>9/3/13/B3264</u> ; 5/11
72	72	N	N	0	<u>12</u> , <u>12/B3264</u> , 12/3/13, 3/13/B3264
73	73	P	P	165	<u>3/13/B3264</u> (156); NT (6); Misc (3)
74	74	N	N	36	3/13/B3264 (18); NT (8); <u>2</u> (5); 8 (5)
75	75	P	P	912	<u>8/25/Imp19</u> (885); NT (18); 14 (4); 13 (3); 6; 2/8/14
76	76	P	P	78	8/25/Imp19 (40); <u>12</u> , 11/12, 12/B3264 (30); 22; NT
77	27L/77	P	P	505	<u>3/13/B3264</u> (209); 28, 13/28 (194); 9, 9/13/28 (45); NT (19); 8/25, 8/28 (10); 5/27/44 (8); 2 (7); 11/12 (3); Misc (10) (ver emm-27L)
78	78	P	P	186	<u>11</u> , 11/12 (158); NT (16); 3/13, 3/13/B3264/5/27/44 (10); 5/11/27; 14/25
79	79	P	P	7	11/12 (5); 4 (2); <u>25/Imp19</u> , NT
80	80	N	N	17	<u>14</u> , 14/B3264 (14); 12 (2); 3
81	81	P	P	71	<u>3/13/B3264</u> (37); NT (11); 12, 12/B3264 (5); 8 (5); 4 (4); 6 (3); 14 (2); 23; Misc (3)
82	82	P	P	202	<u>5/27/44</u> (154); NT (32); 3/13/B3264 (11); 11/12 (3); 4 (1); 8/25 (1)
83	83	N	N	77	<u>3/13/B3264</u> (67); NT (10)
84	84	P	P	0	<u>8/25/Imp19</u>
85	85	P	P	32	B3264, <u>3/13/B3264</u> (24); NT (5); 1 (2); 8/25 (1)
86	86	N	N	4	<u>3/13</u> (2); 1/13/27/28 (1); NT (1)
87	87	P	P	94	<u>28</u> (80); NT (8); 11/12 (4); Imp19 (1); 6 (1)
88	88	P	P	7	NT (3); 28 (2); 4/8 (1); 8/9 (1)
89	89	P	P	518	<u>11</u> , 11/12 (314); 3/13/B3264 (115); NT (86); 4; 28; 27
90	90	P	P	4	13, <u>3/13/B3264</u> (3); 1
91	91	N	N	6	3/13/B3264 (4); 11/28; 12/28; <u>5/27/44</u>
92	92	P	P	98	8/25/Imp19, Imp19 (86); 3/13/B3264 (5); NT (5); 28 (2)
93	93	N	N	4	<u>3/13/B3264</u> (3); NT
	94	P	P	81	<u>3/13/B3264</u> , <u>B3264</u> (77); NT (2); 6; 11
	95	N	N	9	<u>6</u> (5); NT (4)
	96	P	P	5	<u>3</u> (4); 28
	97	N	N	2	NT (2); <u>3/13/14</u>
	98	N	N	7	3 (5); <u>14/B3264</u> , <u>3/13/14</u> ; NT
	99	N	N	9	<u>3</u> , 3/13/B3264, B3264 (7); NT (2); <u>14/B3264</u>
	100	N	N	20	28 (8); 6/28 (4); NT (7); 13/B3264
	101	N	N	45	<u>3/13/B3264</u> (31); 8/25/Imp19 (6); NT (6); 14; 28
	102	P	P	60	<u>3/13/B3264</u> (25); NT (18); 11, <u>12</u> , 11/12 (12); 14 (2); Imp19; 1; 12/B; 12/25
	103	P	P	30	3/13/B3264 (23); NT (4); 12 (2); 6

Tipo M	Tipo emm	SOF	Gen sof	n° de aislados	Patrón de aglutinación T
	104	P	P	9	<u>NT</u> (5); <u>3/B3264</u> (2); 11/12 (2)
	105	N	N	7	<u>1</u> (3); <u>NT</u> (3); 3/B3264
	106	P	P	17	3/13/B3264/5/27/44 (7); 3/13/B3264 (4); <u>5/27/44</u> (3); 4 (2); 8/9; <u>NT</u>
	107	P	P	2	<u>14</u> ; <u>NT</u>
	108	N	ND	16	28 (3); 8/25 (3); 6 (3); <u>NT</u> (3); 5/27/44 (2); <u>B3264</u> ; 13; <u>14</u>
	109	P	P	13	<u>6</u> (11); 28 (2)
	110	P	P	12	<u>NT</u> (6); 6 (2); <u>4</u> (2); 3/13/B3264; 12
	111	N	N	9	<u>28</u> (4); <u>NT</u> (4); 3/12/14
	112	P	P	26	<u>11/12</u> (9); <u>12</u> (5); 8; 8/25 (7); <u>NT</u> (5)
	113	P	P	4	<u>12</u> (3); <u>NT</u>
	114	P	P	129	<u>NT</u> (66); <u>11/12</u> (47); 14 (10); <u>12/B3264</u> ; 5/11; 9; Imp19; 5; 1
	115	N	N	13	<u>NT</u> (10); Imp19; 9; 13
	116	N	N	7	<u>5/27/44</u> (3); <u>NT</u> (3); 14/25
	117	P	P	7	11/12; <u>12</u> (4); <u>NT</u> (2)
	118	P	P	38	<u>3/13/B3264</u> (22); <u>NT</u> (8); 6 (4); 12 (2); 4; 5/27/44/3
	119	N	N	7	<u>NT</u> (4); 14; 3/13/B3264; 12
	120	N	N	8	<u>3</u> (6); 13/14 (2)
	121	N	N	4	3/13/B3264/14; <u>14/B3264</u> ; 13/14; 13/28
	122	N	N	10	<u>3/13/B3264</u> (8); <u>NT</u> (2)
	123	N	N	5	12 (2); <u>13</u> ; 14; <u>NT</u>
	124	P	P	9	<u>11/12</u> ; <u>12</u> (8); <u>NT</u>

2.1.4. El factor de opacidad (SOF)

El 50% de las cepas de SGA poseen la capacidad de producir opacidad del suero de algunos mamíferos (caballo) como resultado de la acción de una α -lipoproteína denominada **factor de opacidad del suero (SOF)**. Esta reacción de opacidad sérica es útil en la identificación serológica de SGA ya que los anticuerpos frente al factor de opacidad son tipo -específicos y se correlacionan con el tipo M. Así la identificación del tipo de factor de opacidad mediante test de inhibición permite la determinación del tipo M del estreptococo A (Cunningham, 2000; Efstratiou, 2000; Facklam, 1999).

2.2. Productos extracelulares de *S. pyogenes*

Durante su crecimiento *S. pyogenes* produce numerosos productos extracelulares, entre ellos están las hemolisinas responsables de la β -hemólisis: estreptolisina O y S.

La estreptolisina O es producida por la mayoría de las cepas de *S. pyogenes* y es inhibida en presencia de oxígeno. Es responsable de la lisis de los eritrocitos y otras células como son los leucocitos y plaquetas, entre otras. En clínica se utiliza la medida de anticuerpos anti- estreptolisina O (ASO) en suero humano como indicador de infección estreptocócica reciente (Bisno, 2005a).

La estreptolisina S se produce en presencia de suero, es estable en presencia de oxígeno, no presenta capacidad antigénica y posee las mismas propiedades para lisar las células que estreptolisina O (Bisno, 2005a).

Otros productos extracelulares pueden facilitar el licuado del pus y la diseminación del estreptococo a través de los tejidos tisulares, características de la celulitis y fascitis necrotizante. Esta capacidad la presentan cuatro enzimas: **ADNasas** (A, B, C y D) que participan en la degradación del ácido desoxirribonucleico; la **hialuronidasa**, que degrada el ácido hialurónico del tejido conectivo; la **estreptoquinasa**, que estimula la disolución de los coágulos por conversión del

plasminógeno a plasmina; y **la peptidasa C5a**, que corta específicamente la quimiotaxina humana C5a en el sitio de unión a los polimorfonucleares (PMN).

2.3. Exotoxinas pirogénicas estreptocócicas (SPE)

2.3.1. Principales características de SPE,

Las exotoxinas pirogénicas estreptocócicas (toxinas eritrogénicas) son proteínas monoméricas de bajo peso molecular (24.000-28.000 Da). Son relativamente resistentes a proteasas y a la desnaturalización por calor (McCormick, 2001; Papageorgiou, 2000; Proft, 2007).

Las exotoxinas estreptocócicas son potentes estimuladores de los linfocitos T y presentan homología con las enterotoxinas estafilocócicas (Abe, 1991; Rago, 1998). Estas toxinas se comportan como superantígenos ya que producen una elevada actividad mitógena sobre determinadas células T sin requerir un procesamiento por parte de las células presentadoras de antígeno (CPA) (Cunningham, 2000; Kotb, 1995).

Los superantígenos (SSGA) se unen a los receptores de los linfocitos T (TCR) y al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) expresado en células presentadoras de antígeno (células B, monocitos y células dendríticas). A diferencia de los antígenos convencionales se sitúan fuera del clásico lugar de unión del antígeno como se muestra en la Figura 5. Este tipo de unión forma unos complejos trimoleculares (TCR-SSGA-MHC II) que ocasionan una mayor proliferación de linfocitos T no específicos que los antígenos normales y la consecuente liberación excesiva de citoquinas inflamatorias: interferón γ , interleuquina 1(IL-1), IL-6 y factor de necrosis tumoral (Figura 6). Los altos niveles sistémicos de estas citoquinas proinflamatorias ocasionan una reacción en cadena en la que se produce un daño en la células endoteliales, cuya consecuencia es la extravasación de los leucocitos sanguíneos a los tejidos circundantes y un daño orgánico (Alouf, 2003; Cunningham, 2000; De Marzi, 2004; Kotb, 1995; Sriskandan, 2007).

Cada superantígeno tiene una afinidad característica por varios motivos β V (Tabla 3). Estos motivos son regiones específicas que forman parte del receptor TCR de

linfocitos (Figura 5). En humanos se han descrito más de 24 familias de genes βV , lo que puede producir una estimulación de más del 25 % de la población de células T de un individuo frente a una activación del 10^{-3} - 10^{-4} % para los antígenos convencionales (Figura 7). Por tanto, el repertorio βV del hospedador podría ser un factor importante en el desarrollo de diversos cuadros clínicos como el síndrome de shock tóxico estreptocócico (De Marzi, 2004; Mascini, 2000; Proft, 2007).

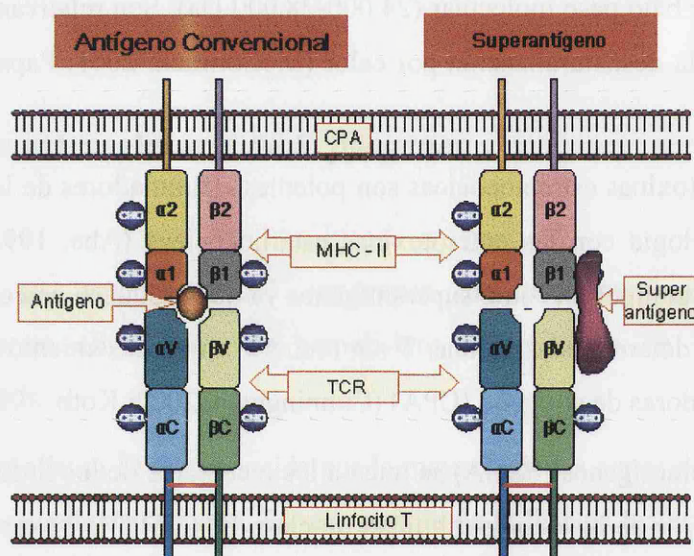


Figura 5. Lugar de unión de un antígeno convencional y un superantígeno. Se representa la membrana celular de un linfocito T y una célula presentadora de antígeno (CPA) con sus respectivos receptores: TCR y MHC-II.

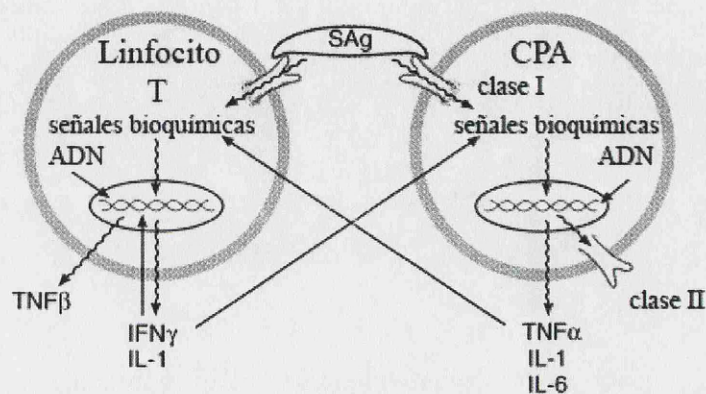


Figura 6. Interacción entre las citoquinas liberadas por el linfocito T y la célula presentadora de antígeno (CPA) e inducción de la cascada de citoquinas inflamatorias por los superantígenos (SAg)(Kotb, 1995).

Superantígenos

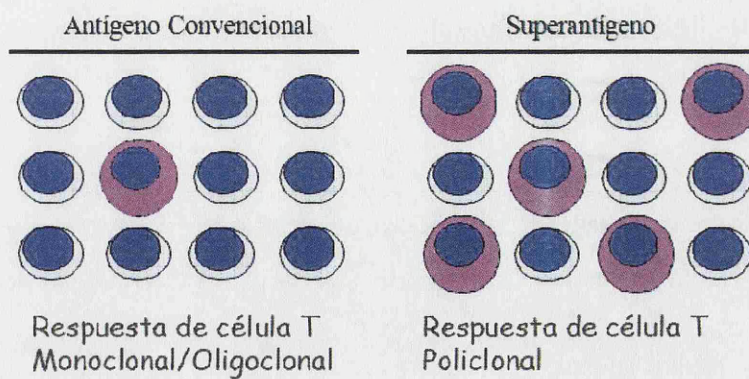


Figura 7. Respuesta de los linfocitos T ante la activación mediante un antígeno convencional y un superantígeno.

2.3.2. Efectos en el huésped

Los principales efectos producidos en humanos como consecuencia de la respuesta ante los superantígenos son los siguientes:

- *Efectos pirogénicos* producidos como consecuencia de la liberación de interleuquina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) que actúan a nivel del hipotálamo (Alouf, 2003; Rago, 1998).

- *Bloqueo del sistema retículoendotelial* y un consecuente aumento de la susceptibilidad del hospedador al shock letal por endotoxinas (Alouf, 2003) .

- *Inmunosupresión de la respuesta celular y humoral*, deleción del repertorio de linfocitos T, anergia y apoptosis de los linfocitos (Alouf, 2003).

Por tanto, la función primaria de los superantígenos parece ser el debilitamiento del hospedador, favoreciéndose el crecimiento y la diseminación del microorganismo (Baker, 2004b).

2.3.3. Superantígenos descritos en *S. pyogenes*

Actualmente en *S. pyogenes* se han descrito 11 superantígenos, este número probablemente se incremente en el futuro tras el análisis de nuevos genomas de *S. pyogenes*. Estos superantígenos se muestran en Tabla 3 (Maripuu, 2008; Prof, 2007; Sriskandan, 2007).

Los genes que codifican las exotoxinas pirogénicas pueden encontrarse en el cromosoma bacteriano o en profagos. Estos genes se indican a continuación (Maripuu, 2008; Proft, 2007):

- Genes de exotoxinas pirogénicas estreptocócicas codificados cromosómicamente: *speG*, *speJ* y *smeZ*
- Genes de exotoxinas pirogénicas asociados con profagos: *speA*, *speC*, *speH*, *speI*, *speK/L*, *speL/M*, *speM* y *ssa*.

Tabla 3. Propiedades funcionales de superantígenos de *Streptococcus pyogenes* (Proft, 2007).

Superantígeno	Peso molecular (kDa)	Estructura cristalina resuelta	Uniones de zinc	Especificidad β V TCR humano	P ₅₀ (h) (pg/ml)
speA	26	+	+	2.1,12.2,14.1,15.1	-
speC	24,4	+	+	2.1,3.2,12.5,15.1	0,1
speG	24,6	-	+	2.1,4.1,6.9,9.1,12.3	-
speH	23,6	+	+	2.1,7.3,9.1,23.1	50
speI	26	-	+	6.9,9.1,18.1,22	0,1
speJ	24,6	+	+	2.1	0,1
speK/L	27,4	-	+	1.1,5.1,23.1	1
speL/M	26,2	-	+	1.1,5.1,23.1	10
speM	25,3	-	+	1.1,5.1,23.1	-
ssa	26,9	-	-	1.1,3,15	-
smeZ-1	24,3	-	+	2.1,4.1,7.3,8.1	0,08
smeZ-2	24,1	+	+	4.1,8.1	0,02

P₅₀ (h): Concentración necesaria para la mitad de la proliferación máxima de linfocitos T humanos En los casos en los que no hay datos sobre P₅₀ se indica con un guión.

En la columna de estructura cristalina, +: estructura resuelta; -: estructura no resuelta. La presencia de uniones de zinc se indica con + y la ausencia con -.

Los superantígenos comparten diferentes niveles de identidad en la secuencia, desde una homología del 20% hasta el 90% (Baker, 2004b). Mientras que los estudios de cristalización han demostrado que los superantígenos presentan una estructura conservada, actualmente se conoce la estructura de cinco de ellos como se muestra en la Tabla 3. La estructura comprende 2 dominios globulares: un dominio N- terminal con estructura de barril- β y un dominio C-terminal en lámina- β unidos por una hélice alfa, mostrado en la Figura 8 (Baker, 2004a, 2004b; Papageorgiou, 2000; Sriskandan, 2007) .

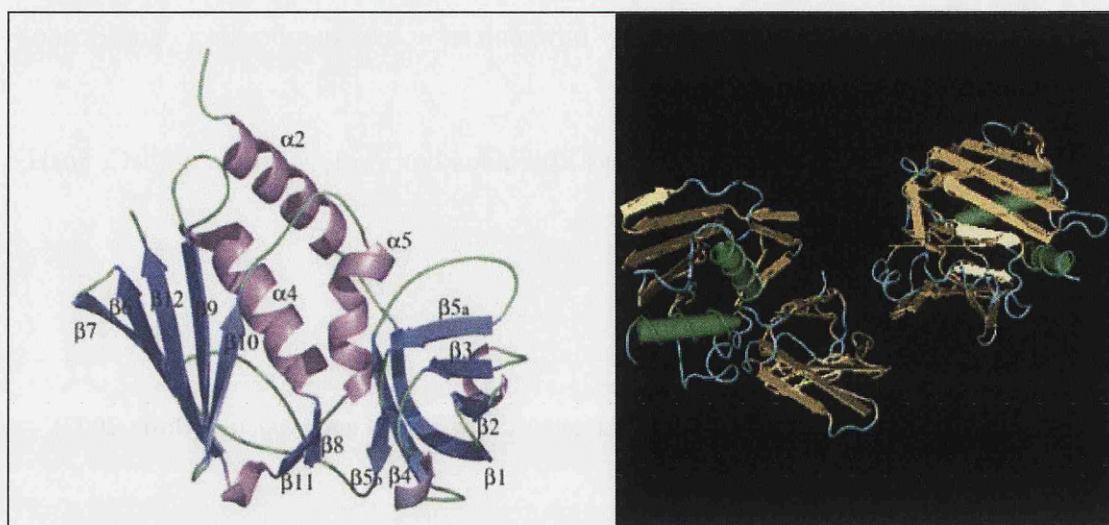


Figura 8. Izquierda: Estructura de *speJ*. Se observa el dominio N-terminal en la parte derecha y el dominio C- terminal en la parte izquierda unidos por hélices alfa (Baker, 2004) Derecha: Estructura de *SmeZ-2* mediante cristalografía (Arcus, 2000).

2.3.3.1. Exotoxinas pirogénicas estreptocócicas A y C (*speA* y *speC*)

speA y *speC* son las primeras toxinas eritrogénicas descritas en SGA, fueron identificadas en 1924 y 1960, respectivamente. Estas toxinas provienen de genes de bacteriófagos que se integran en el cromosoma bacteriano. En la actualidad se han descrito cuatro alelos para cada uno de ellos (Alouf, 2003).

El gen *speA* se transmite horizontalmente entre los clones por transducción mediada por bacteriófagos. Se ha sugerido que la recombinación entre el genoma de fagos es un factor importante en la generación de diversidad y diseminación de los genes de virulencia como *speA* (Mascini, 2000).

speA posee cuatro alelos: *speA1*, *speA2*, *speA3* y *speA4* (Mascini, 1999). Este gen se asocia con elevada frecuencia a los serotipos M1, M3 y M6. Por el contrario, no aparece asociado con M4 y M12 (Sriskandan, 1999).

speA también se ha relacionado con todas las formas de infección invasiva estreptocócica y más concretamente con el síndrome de shock tóxico (Sriskandan, 1999). Así en diversos estudios en los que se ha administrado la toxina *speA* en

animales, se han observado los síntomas del síndrome de shock tóxico estreptocócico (fiebre e hipotensión entre otros) (Cunningham, 2000).

Clones de SGA con los alelos *speA2* y *speA3* han sido descritos en diversos brotes de escarlatina (Mascini, 2000).

En el caso de *speC*, se han descrito los alelos: *speC1*, *speC2*, *speC3* y *speC4* (Alouf, 2003).

2.3.3.2. Exotoxina mitogénica estreptocócica Z (*smeZ*)

El gen *smeZ* presenta una elevada variabilidad alélica (24 alelos) y codifica una proteína altamente polimórfica que muestra variación antigénica. Es el superantígeno bacteriano más potente descubierto hasta el momento, en particular la variante alélica *smeZ-2* (Maripuu, 2008).

smeZ es el estímulo más importante de la producción de citoquinas en *S. pyogenes*, activando células humanas mononucleares (Unnikrishnan, 2002).

La toxina *smeZ* es 18 veces más potente que *speA* produciendo la proliferación de linfocitos; y 10 veces más potente en la capacidad de producir citoquinas (Muller-Alouf, 2001). El alto potencial de virulencia de este superantígeno en el síndrome shock tóxico estreptocócico ha sido demostrado en estudios *in vitro* e *in vivo* (Maripuu, 2008).

2.3.3.3. Superantígeno estreptocócico (*ssa*)

El gen *ssa* se identificó inicialmente en el serotipo M3. Tres alelos han sido descritos por Musser y cols. para este superantígeno: *ssa-1*, *ssa-2* y *ssa-3*. *ssa* está más relacionado con las enterotoxinas estafilocócicas A y C que con toxinas estreptocócicas como *speA*, este hecho puede sugerir una posible transferencia entre géneros (Musser, 1997).

2.3.2.4. Exotoxina pirogénica estreptocócica J (*speJ*)

La toxina *speJ* presenta una similaridad del 47,1% con respecto a *speC*. La consecuencia es que epítomos de *speJ* presentan reacciones cruzadas con epítomos de *speC*. Este hecho sugiere que personas inmunes a *speC* pueden serlo a *speJ*. Se ha sugerido que *speJ* podría tener un papel crucial en el síndrome de shock tóxico estreptocócico y otras enfermedades estreptocócicas agudas (McCormick, 2001; Proft, 2001).

2.3.3.5. Exotoxinas pirogénicas estreptocócicas H e I (*speH* y *speI*)

La toxina *speH* al igual que *ssa* está más relacionada con las enterotoxinas estafilocócicas que con las estreptocócicas.

Los genes *speH* y *speI* pueden aparecer juntos en el mismo bacteriófago o separados. Las sugerencias propuestas para explicar la separación de *speH* e I son la pérdida de *speI* durante la integración en el genoma o la existencia de otro fago que sólo posee *speH* (Commons, 2008).

speI, al igual que *speJ*, se piensa que puede presentar un papel crucial en el síndrome de shock tóxico y otras enfermedades estreptocócicas agudas (Proft, 2001).

2.3.3.6. La cisteína proteasa (*speB*) y el factor mitogénico (*speF*)

En un principio, *speB* y *speF* fueron consideradas dentro de la lista de superantígenos estreptocócicos. Estas proteínas no están genéticamente ni estructuralmente relacionadas con los superantígenos estreptocócicos y además poseen actividad enzimática. Su actividad como superantígenos es controvertida y en la actualidad parece ampliamente aceptado que no son superantígenos (Alouf, 2003; Lintges, 2007; Sriskandan, 1999).

speB es una cisteína proteasa identificada en 1934 y codificada en un gen cromosómico bien conservado en SGA (Cunningham, 2000; Musser, 1997). El gen *speB* lo poseen la mayoría de las cepas de SGA y presenta variación alélica debida a la acumulación de mutaciones puntuales (Chiang-Ni, 2008; Mascini, 2000).

Esta cisteína proteasa se secreta como zimógeno y se convierte en enzima activa mediante escisión proteolítica (Cunningham, 2000). Las principales funciones de *speB* son cortar diversos componentes celulares: matriz extracelular del hospedador, inmunoglobulinas, componentes del complemento, adhesinas de la superficie de SGA (proteína M y proteína F1), peptidasa C5a y varias proteínas de secreción (Chiang-Ni, 2008).

La degradación de estos componentes celulares ocasiona un daño en los tejidos del hospedador. Este hecho soporta la hipótesis de que *speB* es importante en la patogénesis de la enfermedad invasiva estreptocócica. Diversos estudios indican que *speB* promueve la resistencia a la fagocitosis y la diseminación a los órganos, así como la supervivencia extracelular de SGA (Chiang-Ni, 2008; Cunningham, 2000).

Altos niveles de proteasa han sido asociados con síntomas agudos como STSS, necrosis de tejidos blandos y mortalidad. Por otro lado, en otros estudios se ha observado una relación inversa entre la gravedad de la enfermedad y la expresión de *speB* en aislados M1. Estos resultados controvertidos sugieren que la gravedad de las infecciones producidas por SGA no dependen de un factor de virulencia como *speB* (Chiang-Ni, 2008).

En cuanto a la toxina *speF*, comentar que es codificada por un gen cromosómico. La disrupción del gen *speF* ha demostrado que no contribuye significativamente a la actividad superantigénica de SGA al compararla con otros superantígenos. *speF* comparte epítomos idénticos con ADNasaB (Eriksson, 1999; Sriskandan, 2000).

2.3.3.7. Exotoxinas pirogénicas estreptocócicas *speK/L*, *speL/M* y *speM*

speK/L, *speL/M* y *speM* son los genes de superantígenos descritos más recientemente tras analizar diferentes genomas de SGA. La nomenclatura con respecto a estos tres genes es bastante confusa.

El gen *speL* fue identificado en Japón en una cepa con serotipo M3 en 2002. Ese mismo año en EEUU, se analizó el genoma completo de *S. pyogenes* M3, identificando el mismo gen que fue denominado *speK*. Nombre que previamente había sido asignado a un pseudogen en el genoma M1 de *S. pyogenes*. De modo que algunos autores como Proft se refieren a este gen que codifica el superantígeno como *speK/L* (Proft, 2007).

Algo similar ocurrió con *speM*, descubierto en el serotipo M80. Su nomenclatura se vuelve confusa al secuenciar el genoma del serotipo M18 en EEUU, en el que descubren dos superantígenos que denominan como *speL* y *speM*. *speL* es idéntico a *speM* hallado en M80, algunos autores como Proft se refieren a este gen como *speL/M*, mientras que *speM* de M18 no había sido previamente descrito (Proft, 2007).

2.3.4. Exotoxinas pirogénicas estreptocócicas y su relación con diversos cuadros clínicos

Las toxinas estreptocócicas juegan un papel importante en diversas infecciones como: el síndrome de shock tóxico estreptocócico, escarlatina, invasión de tejidos blandos y piel, envenenamiento por consumo de alimentos y fascitis necrotizante (Alouf, 2003; Baker, 2004b; Cunningham, 2000; Proft, 2007).

Los síntomas principales de la escarlatina (ver 3.3.2) se han atribuido a *speA* y *speC*, aunque posiblemente estén implicadas otras toxinas (Alouf, 2003). Estas toxinas estreptocócicas también parecen ser importantes en el desarrollo de las secuelas estreptocócicas (ver 3.4)(Cunningham, 2000).

De forma añadida a los efectos de un superantígeno en el organismo, los factores del huésped son claves en la patogénesis de la enfermedad (Cunningham, 2000; Kotb, 1995).

3. INFECCIONES PRODUCIDAS POR SGA

Streptococcus pyogenes es una bacteria comensal que coloniza el tejido humano. Se estima que entre el 5-10 % de individuos sanos albergan la bacteria, normalmente en el tracto respiratorio. Sin embargo, cuando la bacteria es capaz de penetrar la barrera física de la piel (infección por traumatismo) o el sistema inmunológico del hospedador está comprometido, *S. pyogenes* puede causar gran espectro de enfermedades como se indica en la Tabla 4 (Proft, 2007).

SGA puede crecer en casi todos los tejidos del cuerpo pero el tracto respiratorio superior y las lesiones de piel son los focos primarios de infección y principales reservorios de transmisión (Figura 9) (Efstratiou, 2000).

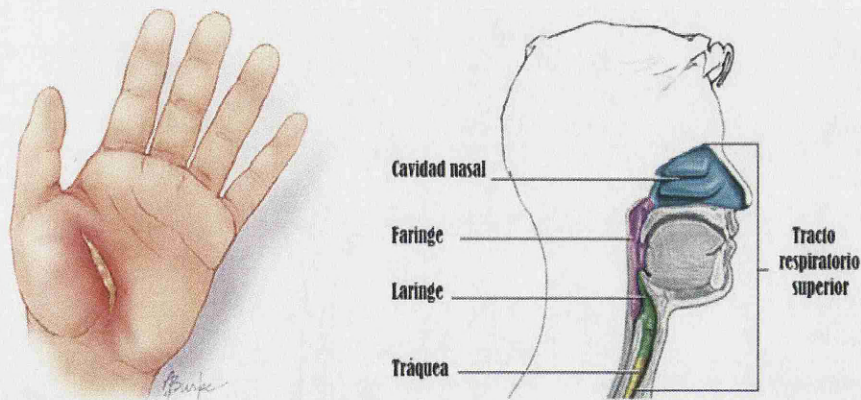
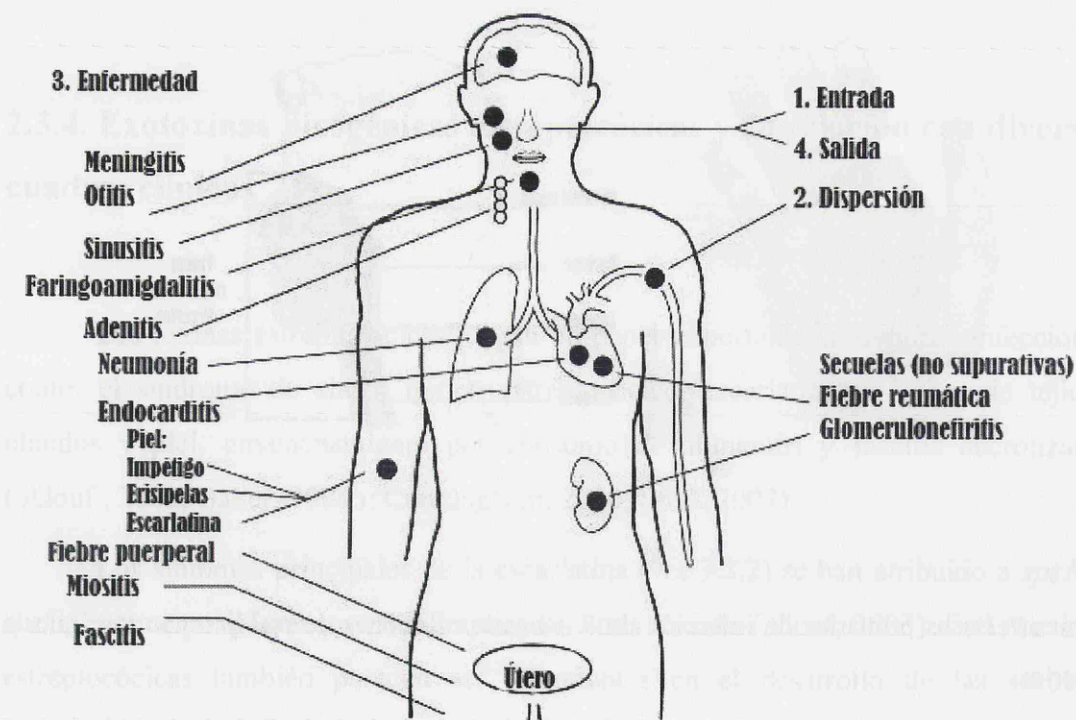


Figura 9. Focos primarios de infección de *S. pyogenes*: lesiones de piel y tracto respiratorio superior.

Tabla 4. Clasificación de las infecciones producidas por *S. pyogenes*.

Tipo de infección	Cuadro clínico
Infecciones superficiales	Faringitis, infecciones cutáneas y tejidos blandos, impétigo, erisipelas, vaginitis, infecciones post-parto
Infecciones profundas	Bacteriemia, fascitis necrotizante, infecciones profundas de tejidos blandos, celulitis, miositis, sepsis puerperal, pericarditis, meningitis, neumonía, artritis séptica
Infecciones mediadas por toxinas	Escarlatina, síndrome de shock tóxico
Enfermedades mediadas inmunológicamente	Fiebre reumática, glomerulonefritis post-estreptocócica, artritis reactiva

**Figura 10.** Localización de diferentes enfermedades producidas por *S. pyogenes*.

El rango de manifestaciones clínicas producidas por *S. pyogenes* son desde simples faringitis e infecciones de tejidos blandos/piel hasta infecciones más serias como bacteriemias, celulitis, sepsis puerperal, meningitis, neumonía o fascitis necrotizante (0 y figura 11) (Lamagni, 2008a). Las infecciones producidas por SGA pueden ser clasificadas en cuatro grupos principales: superficiales, profundas, mediadas por toxinas y enfermedades mediadas inmunológicamente como se indicó en la Tabla 4 (Efstratiou, 2000).

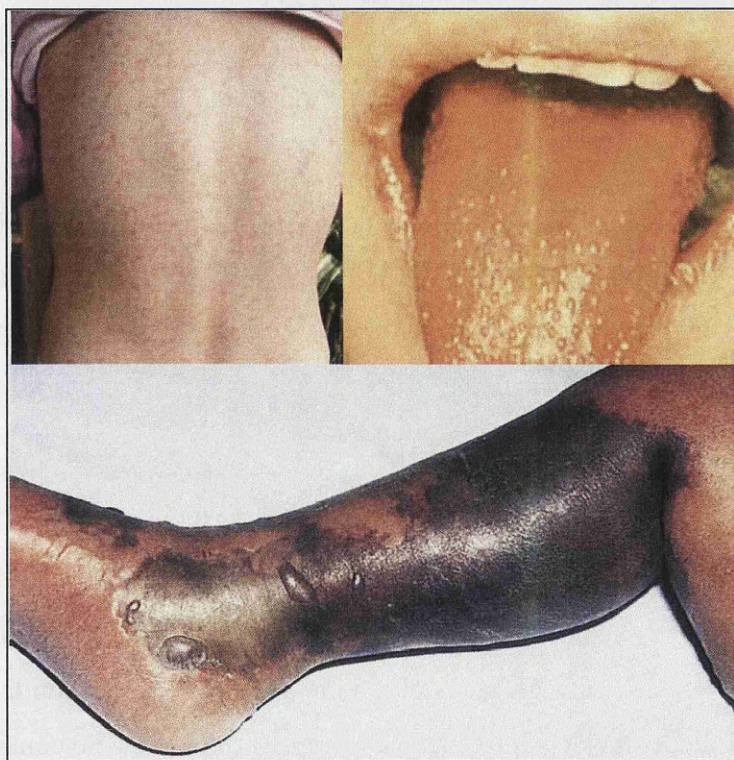


Figura 11. Imágenes de diferentes cuadros clínicos producidos por SGA, en la parte superior se observan manifestaciones clínicas de escarlatina, entre ellas la lengua aframbuesada. En la parte inferior se muestra una fascitis necrotizante en una pierna.

3.1. Infecciones superficiales

3.1.1. Faringitis

S. pyogenes es la principal bacteria causante de faringitis, uno de los cuadros clínicos más comunes en la infancia producidos por este microorganismo. Son susceptibles de padecer esta enfermedad personas de todas las edades, especialmente niños en edad escolar (5-15 años) (Cunningham, 2000; Gerber, 1993; Gonzalo de Liria, 2004).

Los principales síntomas de este cuadro clínico son el dolor de garganta, disfagia, linfadenopatía cervical y fiebre (Cartwright, 1997; Trojavchich, 2001). Este tipo de patología presenta una asociación estacional siendo más frecuente en otoño e invierno (Cartwright, 1997).

Serotipos M concretos se han asociado con infecciones de garganta y fiebre reumática como son: M1, 3, 5, 6, 14, 18, 19 y 24 (no producen factor de opacidad) (Cunningham, 2000; Stollerman, 1997).

3.1.2. Infecciones cutáneas

Las infecciones cutáneas se limitan a la epidermis (cara o extremidades) y son altamente contagiosas (Cunningham, 2000). Su aparición se asocia con la época estival, lo que podría explicar su elevada frecuencia en países tropicales. Se consideran factores de riesgo la obesidad y diabetes, entre otros (Cartwright, 1997).

Las principales infecciones cutáneas producidas por *S. pyogenes* se muestran en la Tabla 5, en la cual se incluyen infecciones de tejidos superficiales y profundos.

El *impétigo* es una enfermedad contagiosa que afecta especialmente a niños en edad preescolar. Su frecuencia es mayor en los meses de verano y otoño.

La *erisipela* se observa con frecuencia en niños y adultos. Es una infección superficial con afectación de los tejidos profundos y marcada afectación linfática. El dorso de la nariz y las mejillas son las localizaciones características de esta enfermedad,

presentando el aspecto denominado de alas en mariposa (Celestin, 2007) (<http://www.uv.es/derma/CLindex/ CLpiodermatitis/ CLPiodermatitis.html>).

Los principales serotipos asociados con infecciones cutáneas y que posteriormente pueden desencadenar una glomerulonefritis postestreptocócica son M2, 49, 57, 59, 60 y 61 (Cunningham, 2000).

3.2. Infecciones invasivas

Las infecciones invasivas o profundas producidas por *S. pyogenes* presentan una tasa de mortalidad superior al 25% a pesar de la instauración del tratamiento.

El origen de la infección es desconocido en la mitad de los casos (Cartwright, 1997). Los principales rasgos de algunas infecciones invasivas estreptocócicas son los siguientes: hipotensión y shock, fallo multiorgánico, toxicidad sistémica, fuerte dolor local, rápida necrosis de tejidos subcutáneos/cutáneos y gangrena.

Las infecciones invasivas más frecuentes son celulitis, fascitis necrotizante, bacteriemias y sepsis puerperal entre otras, explicadas en posteriores apartados.

Se consideran factores de riesgo para el desarrollo de estas infecciones: heridas cutáneas, operaciones quirúrgicas, varicela y quemaduras (Cunningham, 2000). Por otro lado, los serotipos M1 y M3 han sido fuertemente asociados con este tipo de infecciones (Efstratiou, 2000; Gaworzewska, 1988; Mascini, 2000).

3.2.1. Celulitis

La celulitis es una infección aguda de la dermis y tejidos subcutáneos que generalmente aparece como consecuencia de una complicación de una herida, úlcera o dermatosis previa. Suele localizarse en las extremidades inferiores que se encuentran eritemato-edematosas, dolorosas y calientes al tacto (Bisno, 2005a).

Tabla 5. Principales infecciones cutáneas producidas por SGA (<http://www.uv.es/derma/CL/index/CLpiodermitis/CLPiodermitis.html>).

Tipo de lesión	Localización	Presentación clínica	Hallazgos asociados
Impétigo contagioso	Diferentes áreas expuestas	Lesiones vesiculosas	Posterior a pequeños traumatismos o picaduras Prurito o dolor Linfadenopatía regional
Ectima	Extremidades inferiores	Úlceras que se diseminan hacia la dermis	Posterior a traumatismos
Erisipela	70-80% : extremidades inferiores 5-20%: cara	Placas rojas e induradas	Fiebre y leucocitosis
Celulitis	Extremidades inferiores y superiores, tronco, glúteos y cara	Lesiones eritemato-edematosas	Tumefacción local, dolor, eritema, mal estado general, escalofríos, linfadenopatía regional
Celulitis perianal	Región perianal en pacientes pediátricos	Placas eritematosas delimitadas	Dolor localizado
Fascitis necrotizante	Extremidades inferiores. Región genital. Áreas de traumatismo o intervenciones previas	Placas eritemato-edematosas que evolucionan hacia ampollas y gangrena	Fiebre, mal estado general, leucocitosis
Dactilitis estreptocócica	Pulpejo de dedos	Lesiones vesículo-ampollosas	Dolor local

3.2.2. Fascitis necrotizante

La fascitis necrotizante es una infección aguda y grave de los tejidos subcutáneos profundos y de la fascia, sin supuración evidente, pero con gran necrosis del tejido graso y fascia (figura 11). Esta enfermedad es mortal si no se realiza un diagnóstico temprano que permita la instauración de un tratamiento quirúrgico y antibiótico (Stevens, 2000).

Se caracteriza por una rápida y extensa necrosis, que se extiende por los planos de las fascias, para afectar posteriormente a la piel y los tejidos subyacentes (respetando el músculo). Es frecuente que en el transcurso de horas o días, se produzca hipotensión y fallo multiorgánico, ocasionando así un síndrome de shock tóxico estreptocócico.

En los primeros estadios es fundamental un diagnóstico diferencial entre celulitis y fascitis necrotizante. La celulitis responderá al tratamiento antibiótico mientras que la fascitis necrotizante requiere un tratamiento quirúrgico agresivo y amplio, además de la utilización de antibioterapia adecuada. A pesar del tratamiento correcto y los cuidados intensivos, estas infecciones se caracterizan por una elevada mortalidad (30-80%), presentando hasta un 50% de los supervivientes miembros amputados (Mascini, 2000)(<http://www.uv.es/derma/CLindex/CLpiodermitis/CLPiodermitis.html>).

3.2.3. Bacteriemia

Las bacteriemias se producen comúnmente en jóvenes y ancianos. En estas últimas, el origen de la infección suele ser cutáneo. Sin embargo, en el caso de los jóvenes suele estar asociado con infecciones respiratorias o escarlatina, así como con diversos factores de riesgo como: la inmunosupresión e infecciones por los virus varicela zoster o influenza.

La mortalidad por bacteriemia en pacientes tratados es de un 25-30% (Cartwright, 1997).

3.2.4. Sepsis puerperal

La sepsis puerperal habitualmente se presenta como una infección genital post-parto debido a la manipulación con poca higiene (Mascini, 2000).

Este tipo de infección era muy común en la era pre-antibiótica, ocasionando una alta mortalidad en parturientas. Así, la sepsis puerperal ocasionaba el fallecimiento de una de cada seis madres en algunos hospitales europeos en el siglo XIX. Su incidencia ha disminuido de manera espectacular con la introducción de los antibióticos y las medidas de higiene adecuadas (Green, 2005).

El serotipo M28 se ha relacionado con este cuadro clínico, debido a una alta prevalencia de este serotipo en exudados vaginales en mujeres sanas (Gaworzewska, 1988).

3.3. Infecciones mediadas por toxinas

3.3.1. Síndrome de shock tóxico estreptocócico (STSS)

El Síndrome de Shock tóxico estreptocócico (STSS) descrito por primera vez en 1987, presenta una elevada mortalidad y fue denominado así por su similitud con el síndrome del shock tóxico estafilocócico (Cunningham, 2000) (<http://www.uv.es/derma/CLindex/CLpiodermitis/CLPiodermitis.html>).

STSS es una complicación de una infección previa con *S. pyogenes*. Se origina un cuadro clínico grave caracterizado por hipotensión y fallo multiorgánico (Cunningham, 2000; Stevens, 2000).

Habitualmente se relaciona con una infección de tejidos blandos, de modo que el 70% de los pacientes con STSS han presentado una fascitis necrotizante previa (<http://www.uv.es/derma/CLindex/CLpiodermitis/CLPiodermitis.html>).

Los síntomas tempranos del STSS cursan con mialgia, resfriado y fiebre, seguidos de unos síntomas más tardíos como son fiebre persistente, hipotensión sistólica

y shock. La coagulación intravascular diseminada produce una deficiencia en la circulación, gangrena de los miembros y posterior muerte (Alouf, 2003).

Estudios epidemiológicos han relacionado esta enfermedad con los serotipos M1 y M3. Serotipos que producirían diversas exotoxinas (*speA*, *speB*, *speC*, hemolisinas, estreptolisinas O y S, hialuronidasa, ADNasa y estreptoquinasa) implicadas en la patogénesis (Stevens, 2000).

3.3.2. Escarlatina

La escarlatina se asocia con infecciones de garganta pero puede originarse por infecciones en otras áreas del cuerpo. Se caracteriza por erupciones cutáneas, lengua aframbuesada y descamación de la piel (figura 11). En los casos extremos se observa dolor de garganta, linfadenopatía cervical dolorosa, delirio e hiperpirexia.

Este cuadro clínico se asocia con cepas de SGA productoras de toxinas eritrógenas como son *speA*, B y C. Por otro lado, los serotipos M1, 3, 4 y 6 han sido descritos como predominantes en este cuadro clínico (Cartwright, 1997; Cunningham, 2000; Gaworzewska, 1988).

Las descripciones de brotes de escarlatina en instituciones cerradas como guarderías y colegios, entre otras, son muy frecuentes (Chiou, 2009; Feeney, 2005; Hoebe, 2000).

3.4. Infecciones mediadas inmunológicamente

3.4.1. Fiebre reumática

El origen de la fiebre reumática es una infección previa por *S. pyogenes* que en la mayoría de los casos (dos tercios) suele ser faringitis. Este hecho ocasiona que los principales afectados sean niños entre 5 y 15 años.

Entre el 0,3% y el 3% de los pacientes que sufren infección estreptocócica desarrollan fiebre reumática. En el caso de sufrir una faringitis previa, la fiebre

reumática se desarrolla de 2-3 semanas después. Este tipo de enfermedad se presenta en forma de epidemias que son más comunes en poblaciones cerradas o hacinadas (Malagon, 2003).

La fiebre reumática se caracteriza por una inflamación de las articulaciones (poliartritis), tejido cardíaco (carditis), sistema nervioso central (corea), piel (eritema marginatum) y nódulos subcutáneos (Cunningham, 2000).

Por el momento, no está muy claro el mecanismo por el que se produce esta enfermedad. No obstante, se considera una respuesta inmune exagerada ante la infección estreptocócica, que ocasiona un daño en el tejido cardíaco. Esta respuesta ante el propio organismo se debe a la existencia de epítomos comunes entre antígenos cardíacos y estreptocócicos. Esta homología conlleva a la unión de los anticuerpos antiestreptocócicos al tejido cardíaco desencadenando su destrucción. Sin embargo, esto no explica porque sólo unos pocos individuos infectados con cepas reumatogénicas desarrollan la enfermedad.

Se han asociado serotipos concretos (M1, 3, 5, 6, 14, 18, 19 y 24) con complicaciones de la fiebre reumática (Cartwright, 1997; Gaworzewska, 1988; Kaplan, 1989).

En la era preantibiótica, la fiebre reumática de origen estreptocócico fue responsable de la mitad de enfermedades de corazón en África, Asia y Oriente medio (Cartwright, 1997). Se consideraba una enfermedad erradicada en países desarrollados, pero en las últimas dos décadas se han observado epidemias. En muchos países del tercer mundo continúa siendo un problema de salud pública (Malagon, 2003).

Actualmente en todo el mundo, la cardiopatía reumática sigue siendo la causa más frecuente de cardiopatía adquirida en todos los grupos de edad y constituye el 50% de todas las enfermedades cardiovasculares y hasta el 50% de los ingresos cardiológicos en los países en vías de desarrollo (Gerber, 2006).

3.4.2. Glomerulonefritis post-estreptocócica

La glomerulonefritis post-estreptocócica es una complicación no supurada de una infección cutánea, y con menor frecuencia faríngea, causada por cepas nefritogénicas de *Streptococcus*. La glomerulonefritis se desarrolla 1-4 semanas después de estas infecciones, produciendo edema en cara y extremidades, hipertensión, hematuria macroscópica, oliguria, insuficiencia renal y febrícula. Su incidencia es desconocida ya que muchos casos son asintomáticos y afecta predominantemente a niños entre 2 y 10 años (Cunningham, 2000).

Las cepas asociadas con glomerulonefritis son diferentes de las reumatogénicas a excepción del serotipo M1. El serotipo M12 ha sido particularmente asociado con glomerulonefritis post-estreptocócica. Otros serotipos asociados son M2, 4, 6 y 19 (Cartwright, 1997; Gaworzewska, 1988).

El mecanismo de patogenicidad se ha asociado con el depósito de complejos inmunes en el glomérulo, fijación del complemento y daño del tejido mediante procesos inflamatorios (Cartwright, 1997). Se estima que la tasa de mortalidad de esta enfermedad es de un 1% (Carapetis, 2005).

4. EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR *S. pyogenes*

4.1. Mecanismo de transmisión

S. pyogenes se transmite de persona a persona mediante aerosoles generados al toser o al estornudar. También se transmite directamente por contacto físico, siendo frecuente el desarrollo de la infección en núcleos familiares, escolares o institucionales (Mascini, 2000).

S. pyogenes puede sobrevivir durante meses en ambientes desecados como el polvo de una vivienda. Existen investigaciones que demuestran la elevada contaminación ambiental por SGA en mobiliario (alfombras, camas y sillas) (Cartwright, 1997; Sarangi, 1995; Wagenvoort, 2005). En estos estudios se ha

demostrado que la supervivencia ambiental de SGA es de 1-3 meses. Por tanto, se considera que un ambiente contaminado puede constituir un peligro potencial para la transmisión de SGA en cortos periodos de tiempo de un brote. Por el contrario, la supervivencia ambiental durante largos periodos de tiempo, no se considera un factor importante en la transmisión de este microorganismo como sucede con patógenos nosocomiales multirresistentes como *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MARSA), enterococos resistentes a vancomicina, *Clostridium difficile* o *Acinetobacter baumannii* (Wagenvoort, 2005).

Otros focos de infección son alimentos contaminados (entre ellos leche). Estos vehículos de transmisión son infrecuentes y ocasionalmente se describe algún caso (Claesson, 1992; Shemesh, 1994).

4.2. Estado de portador

Como se ha comentado en el apartado 3 se estima que entre el 5-10 % de individuos sanos son portadores de *S. pyogenes*, principalmente en el tracto respiratorio.

La incidencia de portadores faríngeos es altamente variable. La tasa más elevada es observada en niños entre 5-10 años (25%). Tasas superiores al 50% se pueden encontrar transitoriamente en comunidades cerradas o semicerradas como son colegios o centros militares (Cohen-Poradosu, 2007; Ross, 1971).

La mayoría de los portadores son asintomáticos y SGA puede permanecer en la nasofaringe durante meses. Los portadores nasales aunque raros, son mucho más infecciosos que los portadores faríngeos (Cartwright, 1997).

Excepto en situaciones epidémicas, los portadores cutáneos no son comunes, siendo las tasas de colonización mayores en pacientes que presentan enfermedades cutáneas como eczemas, soriasis o heridas (Mascini, 2000).

4.3. Factores de riesgo e incidencia de la infección

Diversos mecanismos de virulencia participan en la patogenicidad de este microorganismo. El hecho de que las infecciones por SGA ocurran esporádicamente con una afectación de 1/100000 habitantes, sugieren que el factor del hospedador predispone a ciertos individuos para padecer estas enfermedades. La presencia de una cepa virulenta es necesaria, pero no suficiente para causar infecciones (Stevens, 2000). De modo que la situación del hospedador es un factor importante en la adquisición de la enfermedad.

En el hospedador se ha descrito que constituyen factores de riesgo: la edad, enfermedades previas como diabetes, varicela, infecciones crónicas cutáneas u otras infecciones agudas y el consumo de drogas parenterales. También juegan un papel importante en la transmisión de la infección por *S. pyogenes* los factores ambientales (tamaño vivienda y el hacinamiento) (Lamagni, 2008a).

La mayoría de los casos de infección de SGA (87-96%) aparecen en el entorno comunitario de manera espontánea, limitando así las estrategias de prevención. Mientras que las tasas de infección de origen hospitalario oscilan entre un 4-13% (Lamagni, 2008a).

La incidencia de la infección presenta un patrón estacional. Las tasas más elevadas se alcanzan en invierno y primavera, observándose un descenso en verano y otoño (Lamagni, 2008a).

4.4. Aspectos epidemiológicos

A nivel mundial, las infecciones por SGA constituyen una causa importante de morbilidad y mortalidad, principalmente en países en vías de desarrollo. Una mortalidad anual superior a 500.000 fallecimientos sitúan a *S. pyogenes* entre los principales patógenos humanos. Únicamente superado por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium falciparum* y *Streptococcus*

pneumoniae. Probablemente su mortalidad es comparable con rotavirus, sarampión, *Haemophilus influenzae* tipo b y el virus de la hepatitis B (Carapetis, 2005).

En la era preantibiótica, las infecciones graves ocasionadas por SGA fueron muy frecuentes (Efstratiou, 2000). Históricamente, la escarlatina y la sepsis puerperal han sido causas de morbilidad y mortalidad elevadas. A finales del siglo XIX sus porcentajes de letalidad fueron superiores al 25% disminuyendo al 2% a partir de 1900 (Lamagni, 2008a). Algunos autores atribuyen esta disminución en la incidencia a una mejora de las condiciones socioeconómicas y al uso de antibióticos a partir de los años 40 (Stevens, 2000). Sin embargo, desde 1980, se observa un inexplicable aumento de infecciones invasivas por SGA en Europa y Estados Unidos (EEUU), destacables por la gravedad de la destrucción del tejido y la toxicidad sistémica de los casos descritos. M1 y M3 son los principales serotipos implicados en este aumento, responsables de brotes y casos fatales (Lamagni, 2008a).

Estudios epidemiológicos indican que el resurgir de las enfermedades invasivas por SGA no se limita a casos esporádicos. Se trata de una diseminación global en la que juegan un papel importante los distintos serotipos.

Los serotipos M1, 3, 18 y 28 han sido descritos asociados a enfermedades invasivas. En concreto, el serotipo M1T1 ha persistido globalmente como el serotipo más frecuente en pacientes con enfermedades invasivas y no invasivas, durante más de un cuarto de siglo (Aziz, 2008). Algunos serotipos como M28 y M89 se han observado con elevada frecuencia en países del Norte de Europa. En EEUU, M1 y M3 fueron prevalentes entre 1970 y 1990 (Efstratiou, 2000). Resultados concordantes se describen en Reino Unido y otros países europeos (Efstratiou, 2000). Los serotipos descritos en algunos países se reflejan en la Tabla 6.

La adquisición de nuevos factores de virulencia por medio de bacteriófagos o transposones se sugiere como una posible explicación de la nueva agresividad de SGA. El hecho de que ciertas cepas de SGA (M1, 3, 6, 11 y 28) se asocien con la mayoría de casos de infecciones invasivas refuerzan esta teoría (Stevens, 2000).

Tabla 6. Descripción de los serotipos de *S. pyogenes* más frecuentes en diferentes países.

País	Año	n° cepas	Origen^a	n° tipos <i>emm</i>_b	Serotipos M_c	Referencia
Europa (12 países)	1997-2000	202	INV	43	1, 3, 28, 12, 22, 89, 6, 81, 83	Schmitz, 2003
Europa (11 países)	2003-2004	4353	INV	104	1, 28, 3, 89, 87, 12, 4, 83, 81, 5	Luca-Harari, 2009
Alemania	1996-2002	464	INV	45	1, 3, 4, 6, 11, 12, 28, 75, 77, 89	Wahl, 2007b
Dinamarca	2003-2004	278	INV	29	28, 1, 3, 89, 12	Luca-Harari, 2008a
Francia	2007	625	INV	48	1, 89, 28	Doloy, 2008
Grecia	2003-2006	943	ENF	NE	173 eriR: 12, 77, 4, 1, 28.	Michos, 2009
			NO ENF		770 eriS: 1, 12, 4, 28, 77.	
Italia	1994-2005	207	INV	32	1, 4, 12, 89	Creti, 2007
Países Bajos	1994-2003	1504	INV	28	1, 3, 89, 28, 12, 6	Vlaminckx, 2005
Rusia	2006	190	INV	NE	INV: 12, 25 NO INV: 74	Martynova, 2008
China	1993-1994	137	ENF y otros	24	3, 1, 4, 12, st1815, 6	Ma, 2009
China	2005-2006	222	ENF y otros	9	12, 1	Ma, 2009
Nepal	1998-1999	120	ENF y EP	45	1, 4, 11, 22	Sakota, 2006
Canadá	1993-1999	4760	INV	54	1, 12, 28, 3, 4, 11, 89, 6, 2, 77	Tyrell, 2002
Canadá	2000-2006	6796	INV	NE	1, 12, 3, 4, 5, 77, 89, 11, 91, 6	Tyrell, 2008
Estados Unidos	2000-2004	5400	INV	NE	1, 3, 28, 12, 89	O'Loughlin, 2007
Hawái	2005-2007	96	INV	33	90, 44, 73	Erdem, 2008
Nueva Caledonia	2006	91	INV	28	15, 92, 106	Hello, 2008

a INV: enfermedad invasiva; NO INV: enfermedad no invasiva; ENF: exudado nasofaríngeo; EP: exudado piel/ b NE: no especificado.

c N° tipos *emm*: Indica el número total de serotipos M descritos en el estudio; eriR: resistente a eritromicina; eriS: sensible a eritromicina.

d Serotipos M: Se indican los serotipos M más frecuentes por orden de prevalencia.

4.4.1. Distribución mundial de la infección por SGA

Se estima que un mínimo de 18,1 millones de personas sufren enfermedades agudas producidas por *S. pyogenes* (fiebre reumática, glomerulonefritis post-estreptocócica, infecciones invasivas, entre otras), con 1,78 millones de casos nuevos cada año. La fiebre reumática es la que presenta mayor prevalencia: 15,6 millones de casos, con 282.000 casos nuevos y 233.000 muertes anuales (Figura 12). Además, se informan más de 111 millones de casos de pioderma y más de 616 millones de faringitis anuales (Carapetis, 2005).

La fiebre reumática es muy común en países del África sub-sahariana y del Pacífico. La prevalencia es más moderada en Asia central/sur y este/norte de África, aparentemente menos común en muchos países asiáticos y Latinoamérica (Carapetis, 2005).

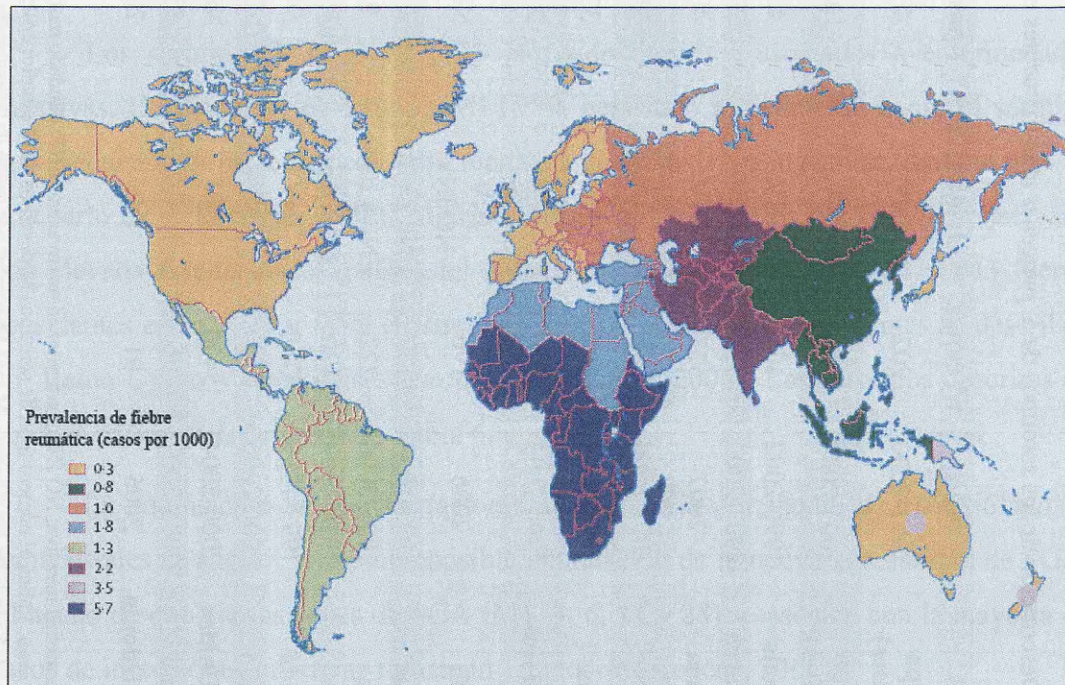


Figura 12. Prevalencia de la fiebre reumática en niños de 5-14 años. Los círculos dentro de Australia y Nueva Zelanda representan la población indígena (Carapetis, 2005).

En EEUU se observan más de 11.500 casos y 1900 exitus anuales, debido a infecciones invasivas producidas por SGA, siendo la mortalidad más elevada en la población anciana (Jordan, 2007). A principios del 2000 en Europa, la incidencia de bacteriemia ha sido de 1,7 y 3,95 /100.000 habitantes, con variaciones considerables entre los diferentes países. No obstante, se ha observado un incremento general en estos países en las dos últimas décadas (Siljander, 2006).

Como se ha comentado en el apartado anterior, a partir 1980 se observa un aumento de infecciones invasivas por SGA en Europa y Estados Unidos. Así por ejemplo, entre 1980-1990 se describieron 8 brotes de fiebre reumática en EEUU y un incremento de infecciones bacteriémicas en Suecia y Estados Unidos (Cunningham, 2000).

El aumento de estas infecciones invasivas durante 1990-2000 en varios países europeos, propicia la aparición de una red de vigilancia europea de enfermedades invasivas producidas por *S. pyogenes*. Esta red de vigilancia se denominó Strep-EURO y fue creada en 2002.

El proyecto Strep-EURO fue fundado por la Unión Europea, participando 11 países: Alemania, Chipre, Dinamarca, Finlandia, Francia, Grecia, Italia, Reino Unido, República Checa, Rumania y Suecia. Este programa de vigilancia ha sido desarrollado durante dos años (2003 y 2004) y se comparan los patrones epidemiológicos de las enfermedades invasivas producidas por SGA (Lamagni, 2008a).

Strep-EURO estima que la incidencia de infección grave en Europa muestra un gradiente decreciente de norte a sur. Los países nórdicos (Finlandia, Dinamarca y Suecia) mostraron una incidencia de 2,2 y 2,3/ 100.000 habitantes mientras que en los países del centro y sur (República Checa, Rumania, Chipre e Italia) la incidencia fue menor con valores de 0.3 -1.5 /100.000 habitantes (Lamagni, 2008a).

4.4.2. Distribución de la infección en España

Las infecciones producidas por *S. pyogenes* no son de declaración obligatoria en España, desconociéndose la verdadera incidencia de este patógeno a nivel nacional.

La escarlatina, no se considera una enfermedad de declaración obligatoria y por tanto, no exige vigilancia semanal, excepto en casos de brote epidémico. En España, se han descrito varios brotes de escarlatina. Entre enero-1999 y marzo-2004 en la Comunidad Valenciana, se detectaron siete brotes en el área de salud 5 y uno en el área de Salud 4. En estos brotes se confirmaron 49 casos de escarlatina (Giner, 2004).

Otras descripciones de brotes epidémicos son : síndrome de shock tóxico en la isla de Gran Canaria en el año 2004 (Medina-Gens, 2005), enfermedad invasiva por *Streptococcus pyogenes* en Vitoria-Gasteiz en 2007 (Castells, 2007), ambas con descripciones de 4 casos.

En España existe poca información disponible sobre los principales serotipos de *S. pyogenes* circulantes a nivel global. Los principales estudios realizados están constituidos por cepas procedentes de nasofaringe y abordan la resistencia a antibióticos (Alberti, 2003; Betriu, 1999; Gordillo, 2003; Granizo, 2000; Perez-Trallero, 2001).

4.5. Vacuna frente a SGA

Ya se ha comentado que SGA es la principal bacteria productora de faringitis, hecho que implica un gasto importante en el sistema de salud (consultas médicas, coste tratamiento, entre otros). Además presenta una elevada dispersión global y una importante incidencia en enfermedades invasivas. Por todas estas razones, es necesario el desarrollo de una vacuna que prevenga ante este tipo de infecciones (Cohen-Poradosu, 2007).

La búsqueda de esta vacuna comenzó en 1930 y en la actualidad todavía no existe una vacuna comercializada (Cohen-Poradosu, 2007; Smeesters, 2008).

El desarrollo de posibles vacunas se centra en proteínas de superficie que juegan un papel importante en la relación huésped-bacteria. En el caso de *S. pyogenes* se han estudiado vacunas frente a diferentes antígenos (regiones específicas proteína M, peptidasa C5a, cisteína proteasa, proteína de unión a fibronectina, hidrato de carbono del grupo A, antígenos de protección estreptocócica, lipoproteínas) (Bisno, 2005b; Smeesters, 2008).

Durante años, el objetivo principal han sido el desarrollo de una vacuna frente a la proteína más virulenta de SGA (proteína M) pero las reacciones cruzadas generadas frente a determinados tejidos del propio organismo (corazón, músculo esquelético, cerebro, membrana glomerular) han dificultado el desarrollo de la misma (Cohen-Poradosu, 2007).

En la actualidad, dos vacunas (basadas en la proteína M) están en fase de experimentación clínica. La primera candidata es una vacuna multivalente frente a 26 tipos *emm*. La otra candidata se espera que cubra un rango más amplio que la anterior, desarrollándose frente a regiones conservadas de repetición C de la proteína M (Smeesters, 2008).

La vacuna multivalente frente a 26 tipos *emm* incluye el 80-90% de los serotipos productores de faringitis y enfermedades invasivas en EEUU. Se calculó que esta vacuna podría prevenir el 49-63% de las infecciones invasivas de SGA en niños y el 43-50% en la población anciana (Cohen-Poradosu, 2007; O'Loughlin, 2007). En la Figura 13 se muestran los diferentes serotipos que cubre la vacuna y la producción de anticuerpos detectada en la fase de experimentación clínica en individuos adultos. Este tipo de vacuna está formada por cuatro proteínas fusión recombinantes, cada una contiene 6 ó 7 péptidos de la región aminoterminal de la proteína M unidos en tándem. La vacuna contiene en total 31 péptidos, 26 pertenecen a diferentes proteínas M, 1 péptido de Spa (nuevo antígeno protector expresado en varios SGA) y 4 péptidos C-terminal que son copias de componentes N-terminal (Figura 14) (Hu, 2002; McNeil, 2005).

El uso de esta vacuna multivalente parece ser prometedor pero está limitado por las características epidemiológicas geográficas y temporales (Smeesters, 2008).

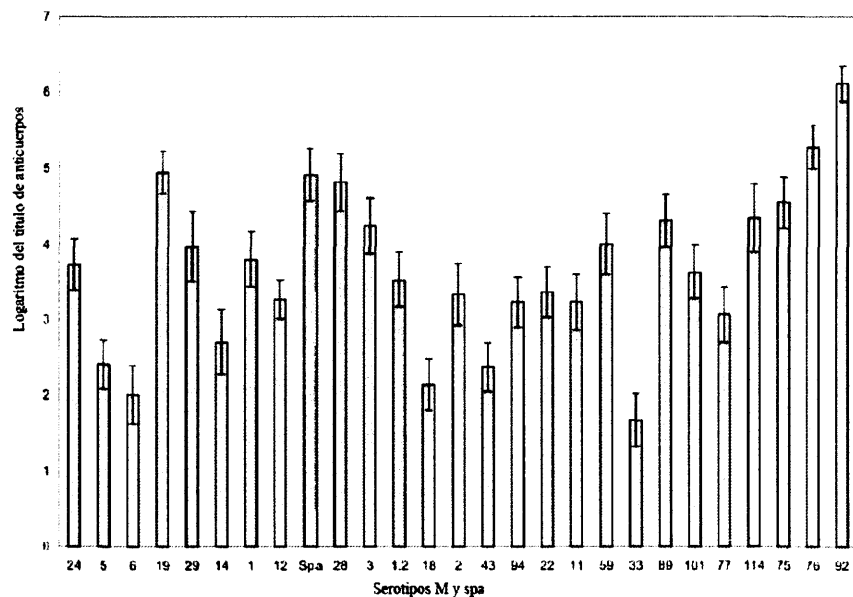
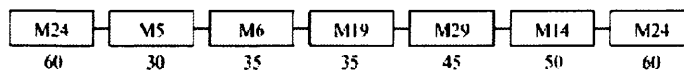
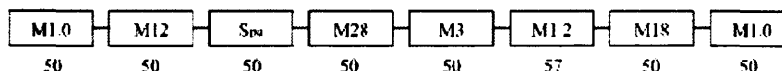


Figura 13. Incremento de la curva logarítmica en los anticuerpos específicos del serotipo M detectados por ELISA después de 3 dosis de la vacuna 26 multivalente de SGA en individuos adultos sanos. Las barras de error indican la desviación estándar. Spa, streptococcal protective antigen (McNeil, 2005).

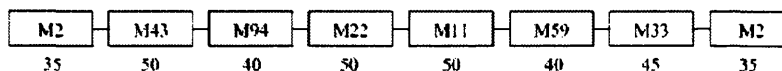
Hexa A.1



Septa B.2



Septa C.2



Septa D.1

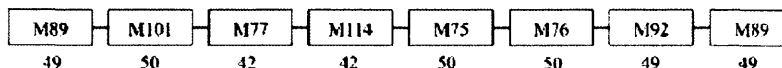


Figura 14. Esquema de la cuatro proteínas fusión recombinantes que contiene la vacuna multivalente frente a 26 tipos M. El número de aminoácidos contenido en cada péptido se indica bajo la designación del tipo M (McNeil, 2005).

En los países occidentales, la población de SGA es oligoclonal (número limitado de tipos *emm*) mientras que un número elevado de tipos *emm* son recuperados de países como India, Etiopía, Nepal y Brasil (Smeesters, 2008). La distinta epidemiología en estos países puede provocar que la cobertura vacunal sea menor en los mismos (Cohen-Poradosu, 2007; Smeesters, 2008).

5. SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

S. pyogenes continúa siendo extremadamente sensible a benzil-penicilina o penicilina G, por lo tanto, constituye el principal tratamiento de elección ante infecciones estreptocócicas. En algunos estudios se observó que la sensibilidad *in vitro* de SGA no se había modificado en los últimos 80 años (Albrich, 2004; Freeman, 2002; Macris, 1998), no habiéndose descrito ninguna cepa resistente a penicilina.

También presenta un perfil de susceptibilidad a cefalosporinas, glicopéptidos y aminoglicósidos.

Los macrólidos y las tetraciclinas constituyen el tratamiento alternativo más común en el caso de pacientes alérgicos a penicilina o en caso de fallo terapéutico (Biedenbach, 2003; Cornaglia, 1999; Mascini, 2000; Seppala, 1998; Uh, 2007).

5.1. Resistencia a macrólidos

5.1.1. Clasificación y estructura química

Los macrólidos son una familia de antibióticos constituidos por un anillo lactónico (8-62 átomos) al que se unen mediante enlaces glucosídicos uno o varios azúcares. En la práctica el nombre de macrólidos se reserva para denominar a la familia de antibióticos formada por compuestos con anillo de 14 (eritromicina, claritromicina, roxitromicina), 15 (azitromicina) o 16 (espiramicina, josamicina, midecamicina) átomos de carbono (Mensa, 2003).

De entre todos los fármacos del grupo, la eritromicina (Figura 15) sigue siendo el de referencia, ya que, por regla general, los que presentan mejores propiedades farmacocinéticas (espiramicina, josamicina y roxitromicina) tienen una menor eficacia antibacteriana (Sevillano, 2006).

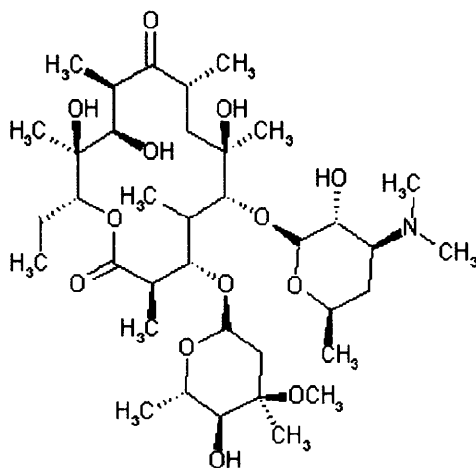


Figura 15. Estructura química de la eritromicina (macrólido de 14 átomos de carbono).

5.1.2. Espectro antimicrobiano

Los macrólidos presentan un amplio espectro antibacteriano, son activos frente a varias especies de microorganismos y protozoos:

- Microorganismos gram positivos tanto cocos (excepto estafilococos resistentes a meticilina y *Enterococcus* spp.) como bacilos (*Clostridium perfringens*, *Propionibacterium acnes*, *Corynebacterium diptheriae*, *Bacillus anthracis*, *Listeria*, *Rhodococcus equii*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*).

- Algunos microorganismos gram negativos (*Moraxella* spp., *Bordetella pertussis*, *Campylobacter jejuni*, *Neisseria* spp., *Haemophilus ducreyi*, *Gardnerella vaginalis*).
- Microorganismos de crecimiento intracelular (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia* spp., *Legionella* spp., *Borrelia burgdorferi*, *Coxiella burnetii*).
- Algunos protozoos moderadamente sensibles (*Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* y *Plasmodium*).

No presentan actividad frente a la mayoría de los bacilos gram negativos, incluidos algunos microorganismos anaerobios (*Bacteroides* spp. y *Fusobacterium* spp.), pero sí frente a *Porphyromonas* y *Prevotella* (Mensa, 2003; Sevillano, 2006).

5.1.3. Mecanismo de acción y resistencias

Los macrólidos actúan sobre los microorganismos uniéndose de forma reversible al dominio V de la subunidad 23S del ARN ribosómico, impidiendo la síntesis proteica. Esto es debido a que bloquean el orificio de entrada al canal por donde sale la proteína del ribosoma, de modo que estimulan la disociación del peptidil-ARNt implicado en la elongación de la proteína, ocasionado así una terminación de la cadena y detención de la síntesis proteica.

Numerosos microorganismos han desarrollado mecanismos de resistencia frente a estos antibióticos, se han descrito tres tipos: **Modificación del lugar de unión, existencia de bombas de expulsión activa y presencia de enzimas inactivantes** (Figura 16) (Mensa, 2003; Sutcliffe, 1996; Weisblum, 1998).

En el género *Streptococcus* se producen principalmente 2 mecanismos de resistencia a macrólidos: metilación del lugar de unión y bombas de expulsión activa (Cornaglia, 1999; Freeman, 2002; Malhotra-Kumar, 2005).

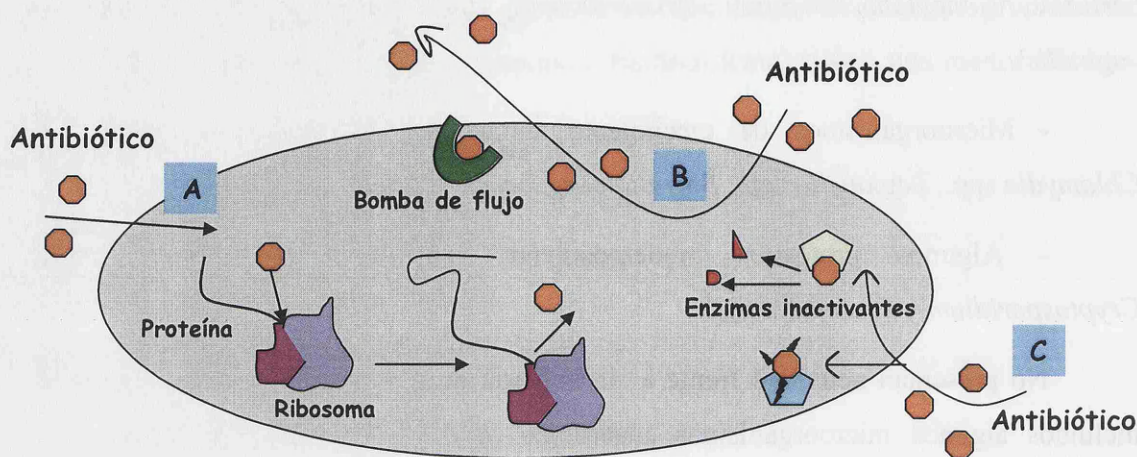


Figura 16. Principales mecanismos de resistencia frente a macrólidos: modificación del lugar de unión al ribosoma (A), bombas de expulsión activa (B) y enzimas inactivantes (C).

5.1.3.1. Modificación del lugar de unión

Se modifica el lugar de unión del macrólido al ribosoma mediante *metilación* de residuos de adenina (especialmente A2058 y A2059) o por *cambios en la secuencia de bases* de ARNr 23S o de las proteína ribosómicas L4 y L22.

- **A. La metilación** del lugar de unión al ribosoma la producen unas enzimas denominadas metilasas o N-metiltransferasas, codificadas por la familia de genes *erm* (erythromycin ribosome methylation) (Leclercq, 2002; Roberts, 1999).

La metilación produce un cambio conformacional en el ribosoma que disminuye la unión de macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B, provocando resistencia a estos tres antibióticos y dando lugar al fenotipo denominado MLS_b "macrolide lincosamide streptogramine B" (Mensa, 2003; Roberts, 1999; Seppala, 1998). Esta resistencia cruzada se debe a que el sitio de unión de los macrólidos a la subunidad ribosómica solapa con el de estos 2 antibióticos no relacionados estructuralmente (Roberts, 1999).

El fenotipo MLS_b puede ser:

- **Constitutivo (MLS_b c):** La enzima que metila el residuo de adenina se produce continuamente, generalmente en esta resistencia está implicado el gen *erm(B)* en SGA (Cornaglia, 1999; Michos, 2009; Perez-Trallero, 2007; Woo, 2003).

- **Inducible (MLS_b i):** Se requiere la presencia de un antibiótico inductor para la producción de la metilasa, en esta resistencia generalmente está implicado el gen *erm(TR)* en SGA (Cornaglia, 1999; Perez-Trallero, 2007). En este caso la bacteria produce ARNm inactivo, incapaz de codificar la metilasa debido a un atenuador del gen *erm(TR)*. En presencia del antibiótico se produce un reordenamiento del ARNm que permite la traducción de la metilasa (Leclercq, 2002).

En la metilación postranscripcional del ARNr 23S se pueden añadir uno o dos grupos metilos en un residuo de adenina (A2058 ó A2057 ó A2059) en función del gen que codifica la metilasa. La monometilación origina resistencia cruzada a todos los macrólidos, la clindamicina y la estreptogramina B (quinupristina). La dimetilación confiere resistencia además a telitromicina.

Debido al aumento de los genes *erm* descritos y a la existencia de una nomenclatura confusa, Roberts y cols (Roberts, 1999) proponen una nueva nomenclatura para los genes. Dos genes que presentan en su secuencia de aminoácidos una homología mayor o igual al 80% pertenecen a la misma clase y se designan con la misma letra o número, mientras que dos genes con una homología menor o igual al 79% se designan con letras o números diferentes (Roberts, 1999).

Se han descrito 33 genes *erm* diferentes que codifican para metilasas ARNr como se muestra en la Tabla 7 (Roberts, 2008). Estas metilasas están presentes en diferentes especies y géneros. En el género *Streptococcus* se han descrito seis genes que codifican metilasas: *erm(A)* o *erm(TR)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *erm(F)*, *erm(Q)* y *erm(T)*; siendo este último el más recientemente descrito (Roberts, 1999, 2008). *erm(TR)* y *erm(B)* son los genes más comúnmente observados en *S. pyogenes* (Amezaga, 2006; Mensa, 2003; Roberts, 2008; Seppala, 1998).

Los genes *erm* se han asociado con transposones conjugativos o no conjugativos, aunque en algunos casos se han encontrado en plásmidos (Brenciani, 2007; Giovanetti, 2003; Roberts, 1999). La mayoría de los plásmidos estreptocócicos que llevan determinantes de resistencia a antibióticos son conjugativos y se transfieren por

conjugación entre diferentes especies de *Streptococcus* y especialmente entre cepas de *S. pyogenes* por transducción (Seppala, 1998).

Tabla 7. Diferentes genes implicados en los mecanismos de resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas (Roberts, 2008). En negrita se indican los genes de resistencia a macrólidos descritos para *Streptococcus*.

	Metilasa ARNr	Bomba flujo	Enzimas inactivantes n=19			
	n=33	n=14	Esterasas n=2	Liasas n=2	Transferasas n=11	Fosforilasas n=4
Listadas en 1999	n=20	n=10	n=2	n=2	n=7	n=3
	<i>erm</i> (A), <i>erm</i> (B), <i>erm</i> (C) <i>erm</i> (D), <i>erm</i> (E), <i>erm</i> (F) <i>erm</i> (G), <i>erm</i> (H), <i>erm</i> (I) <i>erm</i> (N), <i>erm</i> (O), <i>erm</i> (Q) <i>erm</i> (R), <i>erm</i> (S), <i>erm</i> (T) <i>erm</i> (U), <i>erm</i> (V), <i>erm</i> (W) <i>erm</i> (X), <i>erm</i> (Y)	<i>car</i> (A), <i>msr</i> (A) <i>ole</i> (B), <i>ole</i> (C) <i>srn</i> (B), <i>tlr</i> (C) <i>vga</i> (A), <i>vga</i> (B) <i>lmr</i> (A), <i>meß</i> (A)	<i>ere</i> (A) <i>ere</i> (B)	<i>vgb</i> (A) <i>vgb</i> (B)	<i>lnu</i> (A), <i>lnu</i> (B) <i>vat</i> (A), <i>vat</i> (B) <i>vat</i> (C), <i>vat</i> (D) <i>vat</i> (E)	<i>mph</i> (A) <i>mph</i> (B) <i>mph</i> (C)
No listadas en 1999	n=13	n=4	n=0	n=0	n=4	n=1
	<i>erm</i> (Z), <i>erm</i> (30), <i>erm</i> (31) <i>erm</i> (32), <i>erm</i> (33), <i>erm</i> (34) <i>erm</i> (35), <i>erm</i> (36), <i>erm</i> (37) <i>erm</i> (38), <i>erm</i> (39), <i>erm</i> (40) <i>erm</i> (41)	<i>msr</i> (C), <i>msr</i> (D) <i>lsa</i> (A), <i>lsa</i> (B)			<i>lnu</i> (C), <i>lnu</i> (D) <i>lnu</i> (F), <i>vat</i> (F)	<i>mph</i> (D)

B. Cambios en la secuencia de bases de ARNr 23S o de las proteínas ribosómicas L4 y L22. Estas mutaciones cromosómicas son muy raras probablemente porque existen numerosas copias del operon *rrn* que codifica el ARNr 23S (Mensa, 2003; Sevillano, 2006).

Las mutaciones en ARNr 23S producen un incremento en la resistencia a macrólidos, lincosamidas, estreptogramina B, telitromicina y linezolid, tanto en bacterias gram positivas como gram negativas. Han sido identificadas varias mutaciones pero la más común es en el dominio V de ARNr 23S con mutaciones en las posiciones A2058 ó A2059 (numeración de *E. coli*). Este tipo de mutaciones han sido identificadas en 8 géneros gram positivos y 9 gram negativos, incluyendo los patógenos intracelulares *C. trachomatis* y 2 especies de *Treponema* (Roberts, 2008).

Las mutaciones en las proteínas ribosomales L4 y L22 se producen por deleciones o inserciones que añaden o eliminan uno o más aminoácidos de la proteína. Estas mutaciones alteran la estructura terciaria de ARNr 23S en el dominio V e influye indirectamente en la afinidad por el macrólido. La mutación L4 ha sido descrita en 3 géneros gram positivos y 5 gram negativos. La mutación L22 ha sido descrita en 4 géneros gram positivos y 5 gram negativos (Roberts, 2008). Este tipo de mutaciones se seleccionan durante el tratamiento (Mensa, 2003).

En *S. pyogenes*, las descripciones de este tipo de resistencia producidas por mutaciones en ARNr 23S, L4 y L22 son relativamente nuevas. Por tanto, este hecho podría indicar un nuevo tipo de resistencia emergente o que su prevalencia ha sido subestimada (Malbruny, 2002; Roberts, 2008).

En *S. pyogenes* se han descrito mutaciones en: el dominio V de ARNr 23S (posición C2611), en la proteína L4 (posiciones 64,65, 66, 69,70,72) y en L22 (Bingen, 2002; Bozdogan, 2003; Malbruny, 2002; Roberts, 2008).

5.1.3.2. Bomba de expulsión activa

Las bombas de expulsión activa son unas proteínas presentes en la membrana celular que extraen específicamente macrólidos de 14 y 15 átomos de carbono, mantienen la concentración intracelular a bajas concentraciones y por tanto, los ribosomas libres de la acción antibiótica. Estas bombas son poco o nada efectivas frente a los macrólidos de 16 carbonos, telitromicina y clindamicina, este fenotipo se denomina **fenotipo M** (Cornaglia, 1999; Malhotra-Kumar, 2005; Mensa, 2003; Roberts, 1999).

En bacterias gram positivas se han descrito tres tipos de bombas de expulsión activa: ATPasas de tipo ABC (ATP binding cassette), superfamilia del facilitador mayor (MFS) y la pequeña familia de resistencia a múltiples antibióticos (SMR) (Depardieu, 2007; Leclercq, 2002).

El fenotipo M en cocos gram positivos normalmente esta mediado por 3 sistemas: los genes *mef* (macrolide efflux), *msr* (macrolides and estreptogramin B resistance) y *vga* (virginiamycin factor A) (Perez-Trallero, 2007; Roberts, 1999). En

otros microorganismos como los productores de antibióticos se describen otros tipos de genes como son *tlr*(D), *car*(B), *myr*(B) y *smr*(A) (Tabla 7)(Roberts, 2008).

Los genes *mef* se han encontrado en variedad de géneros gram positivos, incluyendo corinebacterias, enterococos, micrococos y variedad de especies de estreptococos (Leclercq, 2002; Roberts, 1999).

En *Streptococcus* los principales genes asociados con el fenotipo M son *mef*(A/E) y *msr*(D) que codifican para dominios transmembrana de la bomba y de unión a ATP, respectivamente (Cornaglia, 1999; Malhotra-Kumar, 2005; Roberts, 1999). El gen *msr*(D) se ha descrito recientemente en SGA, se sitúa posteriormente al gen *mef*(A/E) y presenta similaridad con *msr*(A) de *Staphylococcus* spp (Ojo, 2006). En cuanto al gen *mef* hay dos variantes en estreptococos con un 90% de identidad en la secuencia: *mef* (A) – descrita en *S. pyogenes* por primera vez- y *mef* (E)- descrita en *S. pneumoniae*-. No son específicas de especie y ambas deben ser designadas *mef*(A) o *mef*(A/E) (Amezaga, 2006). Estos genes *mef* parecen ser transferidos en diferentes elementos genéticos (Tn1207.1, Tn1207.3, elemento quimérico 58.8kb), todos parecen ser profagos asociados a *S. pyogenes* (Amezaga, 2006). La combinación conjunta de los genes *erm*(B) y *mef*(A) ha sido descrita en *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* y *S. agalactiae*, presentando un fenotipo MLS_B (Leclercq, 2002).

5.1.3.3. Enzimas inactivantes

Las enzimas inactivantes modifican el anillo lactónico de los macrólidos de 14 átomos de carbono, se han descrito esterasas, liasas, transferasas y fosforilasas mostradas en la Tabla 7 (Damaso, 2006; Roberts, 1999).

Esterasas (genes *ere*) y fosforilasas (genes *mph*), descritas en enterobacterias, producen resistencia a macrólidos de 14 y 15 carbonos pero no a lincosamidas. Este tipo de resistencia no fue considerado relevante en la clínica de enterobacterias, ya que los macrólidos no se usan como tratamiento frente a estos microorganismos. En el caso de cepas de *S. aureus* este tipo de resistencia es más preocupante, para el que se han descrito fosforilasas codificadas por los genes *mph*(C) (Roberts, 2008; Sevillano, 2006).

Las nucleotidil transferasas codificadas por genes *lnu*(A) en estafilococos y *Enterococcus faecium*, sólo inactivan lincosamidas (Roberts, 2008).

Estas enzimas codificantes se han identificado en lactobacilos, enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y estafilococos (Roberts, 1999). Actualmente se han descrito 19 enzimas inactivantes como se muestra en la Tabla 7. En *Streptococcus* se han descrito genes que codifican transferasas que confieren resistencia a estreptogramina A: *lnu(C)*, *lnu(D)* (Roberts, 2008).

5.1.4. Epidemiología de la resistencia a macrólidos

Como se ha mencionado anteriormente, los macrólidos constituyen un tratamiento alternativo ante las infecciones de *S. pyogenes*. El elevado consumo de macrólidos, ha originado un aumento en las tasas de resistencia para SGA registrando valores superiores al 40% (Biedenbach, 2003; Cornaglia, 1999; Mascini, 2000; Seppala, 1998; Uh, 2007). Los primeros datos de cepas de *S. pyogenes* resistentes a macrólidos fueron descritos en 1959 en Reino Unido. A partir de entonces, en varias partes del mundo, se registran diferentes casos y brotes asociados con cepas resistentes a macrólidos (Suecia, Reino Unido, Japón, Finlandia, Italia)(Cornaglia, 1999).

A principios de 1990, comienza a observarse un notable incremento en la resistencia a eritromicina de SGA en varios países europeos. Observándose una mayor incidencia en países mediterráneos frente a regiones escandinavas (Jasir, 2000; Palmieri, 2006). Datos recientes muestran elevada incidencia en países asiáticos y por el momento, no parece ser un problema en EEUU (Leclercq, 2002). En la 0 se muestran varias tasas de resistencia a macrólidos descritas en diferentes países.

En el caso de España la resistencia global es de 20-30%, observando valores más bajos (10-16%) en el norte de España (Santander, San Sebastián, Bilbao, Guipúzcoa) y tasas de incluso un 60% de resistencia en Córdoba y sur de España (Ardanuy, 2005; Gordillo, 2003; Morosini, 2003; Perez-Trallero, 2001, 2007; Tamayo, 2005). Se han descrito varios clones circulantes en España que presentan resistencia a macrólidos: *emm12T12*, *emm4T4*, *emm75T25* y *emm28T28* (Alberti, 2003; Perez-Trallero, 2004, 2007).

Tabla 8. Tasas de resistencia a macrólidos descritas en diferentes países.

País	Año	n° cepas	Origen	Resistencia eritromicina (%)	Referencia
Alemania	1999-2000	381	ENF Piel	14, 2	Reinert, 2004b
Alemania	2002-2003	236	ENF	14, 0	Reinert, 2004a
Francia	2002-2003	322	ENF	22, 4	Bingen, 2004
Grecia	2004-2007	1.228	ENF	2004: 7, 7 2005: 10, 4 2006: 9, 8 2007: 18, 5	Panagea, 2008
Italia	1994-1996	207	INV	26, 5	Creti, 2007
Italia	2003-2005		INV	18, 9	Creti, 2007
Italia (Roma)	2000	355	ENF	35, 7	Dicuonzo, 2002
Noruega	1993-2002	1.657	varios	2, 7	Littauer, 2006
Portugal	1998-2003	1.321	ENF	26, 6	Silva-Costa y cols, 2005
República Checa		89		20, 2	
Eslovaquia		53		34, 0	
Hungría	2005-2006	90	varios	26, 7	Gracia, 2009
Polonia		277		17, 0	
Rumania		180		7, 8	
Países bálticos		74		4, 1	
Israel	1996-1999	530	varios	1, 8	Nir-Paz, 2006
Irán	1995-1997	1.335	ENF	0, 2	Jasir, 2000
China	2005-2006	222	ENF	97, 3	YaolingMa, 2008
Estados Unidos	1999-2006	3.325	INV	9, 1	Beneden, 2008
Canadá	2001	500	ENF	14, 4	Katz, 2003
España (Guipúzcoa)	1988-1997	2.561	ENF	12, 1	Perez-Trallero, 1999
España (Barcelona)	1999-2003	126	INV NO INV	27, 8	Rivera, 2006
España (Guipúzcoa y Madrid)	1999-2005	17.232	>85% ENF	21, 3	Perez-Trallero, 2007
España	2004	530	ENF y otros	21, 7	Tamayo, 2005

Abreviaturas: ENF: Exudado nasofaríngeo; INV: infecciones invasivas; NO INV: infecciones no invasivas.

5.2. Resistencia a tetraciclinas

5.2.1. Clasificación y estructura química

Las tetraciclinas son una familia de productos naturales (clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina) y semisintéticos (doxiciclina, minociclina) producidas por diferentes especies de *Streptomyces* spp. que actúan inhibiendo la síntesis de proteínas bacterianas (Dámaso, 2006; Perez-Trallero, 2003).

Las tetraciclinas poseen un núcleo de estructura tetracíclica lineal compuesta de cuatro anillos fusionados (Figura 17). La suma de los diferentes grupos funcionales ha dado lugar a numerosos compuestos que pueden agruparse en tres generaciones según el orden de su descubrimiento (Dámaso, 2006; Perez-Trallero, 2003).

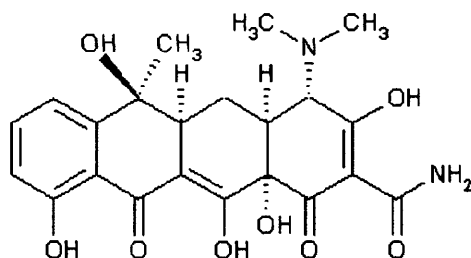


Figura 17. Estructura de la tetraciclina.

5.2.2. Espectro antimicrobiano

Las tetraciclinas poseen un amplio espectro antimicrobiano, son inicialmente activas frente a bacterias gram positivas, gram negativas, chlamydias, micoplasmas, rickettsias y algunos protozoos. En la actualidad su uso es limitado debido a la resistencia adquirida (Connell, 2003; Perez-Trallero, 2003; Villedieu, 2003).

Las tetraciclinas fueron el primer grupo de antibióticos denominado de amplio espectro. Debido a esta característica, a su relativa seguridad y su bajo coste, han sido utilizados ampliamente en todo el mundo (Roberts, 2002).

5.2.3.2. Bombas de expulsión activa

Son unas proteínas denominadas “major facilitator superfamily” (MFS) que se asocian a la membrana y expulsan el antibiótico fuera de la célula. Este tipo de resistencia a tetraciclina es una de las mejor estudiadas (Chopra, 2001).

Los genes que codifican las bombas de expulsión activa se observan tanto en microorganismos gram positivos como gram negativos (Chopra, 2001; Roberts, 2005).

Se han descrito 23 genes que codifican para bombas de flujo mostrados en la Tabla 9 (Roberts, 2005). *tet(K)* y *tet(L)* son los responsables de esta resistencia en *Streptococcus*, resistencia poco común en este género (Chopra, 2001).

5.2.3.3. Genes de resistencia a tetraciclina y su asociación con elementos móviles

Tanto el bombeo activo como la protección de la inhibición del ribosoma son mecanismos de resistencia clínicamente relevantes y ambos suelen estar relacionados con la adquisición de elementos móviles de resistencia. Existen muchos genes de resistencia a tetraciclina y un gran número de ellos se asocian con elementos móviles, sea en forma de plásmidos, transposones o integrones. En los integrones, junto al gen que confiere resistencia a tetraciclinas, con frecuencia se encuentran otros genes (*gene cassettes*) que confieren resistencia a otros antibióticos (Perez-Trallero, 2003).

Muchos estreptococos comensales orales del grupo viridans han adquirido *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(L)* o *tet(K)*, así como las especies patógenas de estreptococos *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*. A lo largo del tiempo las bacterias comensales gram positivas han pasado de llevar genes *tet* individuales a llevar múltiples genes *tet*. (Chopra, 2001).

El gen *tet(M)* a menudo está asociado con elementos conjugativos como la familia de transposones Tn916-Tn1545. Esta familia de transposones conjugativos está ampliamente distribuida en diferentes géneros bacterianos. Como se ha comentado, con frecuencia se encuentran asociados estos elementos móviles con otros genes (gene cassettes) que confieren resistencia a otros antibióticos. La combinación de *tet(M)* y *erm(B)* es común en gram positivos como estreptococos, estafilococos y enterococos (Ayer, 2007; Brenciani, 2007; Chopra, 2001; Malhotra-Kumar, 2005; Roberts, 2005; Valdezate, 2009).

El gen *tet(O)* en un principio no se asocia con elementos conjugativos, es móvil sólo en plásmidos conjugativos y puede ser transferido entre estreptococos y *Campylobacter* (Chopra, 2001). Sin embargo, se ha observado que el modo de diseminación ha cambiado con la reciente caracterización de transposones conjugativos que llevan *tet(O)* unido a *mef(A)* o *erm(A)* (Bacciaglia, 2007; Giovanetti, 2003; Malhotra-Kumar, 2005; Roberts, 2005). Estos transposones son transferidos por conjugación entre diferentes cepas de *S. pyogenes* y *Enterococcus faecalis*. Este nuevo elemento conjugativo puede permitir la amplia diseminación de este gen en el futuro (Roberts, 2005).

5.2.4. Epidemiología de la resistencia a tetraciclina

Las tetraciclinas además de presentar un amplio espectro de acción, son uno de los antibióticos disponibles más baratos. Sin embargo, la emergencia de resistencia bacteriana a este antibiótico y el desarrollo de agentes alternativos ha limitado su uso (Chopra, 2001).

En países como Reino Unido, España y EEUU se ha restringido su uso en medicina, disminuyendo su aplicación en el caso de humanos (Bremont, 2000; Davey, 1996; McCaig, 1995). A pesar de la prohibición de la Unión Europea como promotores de crecimiento en animales, parece que su administración continúa siendo una práctica habitual en el uso veterinario (Perez-Trallero, 2003).

A mediados de 1970, la resistencia a tetraciclina fue común en enterobacterias, estafilococos, estreptococos y bacteroides. En el caso de *S. pyogenes*, la información

disponible para este antibiótico es menor que en el caso de macrólidos. En general se observan unas elevadas tasas de resistencia en los diferentes países del mundo como se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. Tasas de resistencia a tetraciclina descritas en diferentes países.

País	Año	nº cepas	Origen	Resistencia tetraciclina (%)	Referencia
Dinamarca	1990-1999	92	NI	33, 7	Hammerum, 2004
Grecia	2003-2006	1160	varios	18, 9	Michos, 2009
Portugal	1998-2003	1321	ENF	38, 7	Silva-Costa, 2005
Corea	2003-2004	63	varios	19, 0	Uh, 2007
Israel	1996-1999	530	varios	23, 6	Nir-Paz, 2006
Irán	1995-1997	1335	ENF	42, 0	Jasir, 2000
China	2005-2006	222	ENF	94, 1	YaolingMa, 2008
Japón	1991-2003	120	varios	26, 7	Matsumoto, 2005
España (Madrid)	1988-1992	330	varios	10,9	Betriu, 1993
España (Madrid)	1992-1994	573	varios	7,3	Orden, 1996
España (Barcelona)	1999-2003	126	INV NO INV	25,4	Rivera, 2006

Abreviaturas: ENF: Exudado nasofaríngeo; INV: infecciones invasivas; NO INV: infecciones no invasivas; NI: no indicado.

En general, las tasas de resistencia en España son más bajas que en otros países. Los principales datos proceden de Madrid con 7,3% de resistencia entre 1992-1999 y 13,1% entre 1994-2001, sin embargo se describen valores de hasta un 25,4% entre 1999-2003 en Barcelona (Betriu, 2004; Orden, 1996; Rivera, 2006).

OBJETIVOS

Streptococcus pyogenes es el agente causal de una extensa variedad de cuadros clínicos. En las últimas cuatro décadas, la incidencia de las enfermedades producidas por SGA han experimentado una disminución en los países industrializados llegándose a considerar casi completamente erradicadas. Sin embargo, en 1980 se observa una reemergencia de enfermedades invasivas graves como fiebre reumática, síndrome de shock tóxico estreptocócico, bacteriemia, fascitis necrotizante e incluso brotes epidémicos de escarlatina (Cunningham, 2000; Efstratiou, 2000). Al mismo tiempo se ha observado un incremento en la resistencia a antibióticos empleados como tratamiento alternativo a la penicilina, principal antibiótico de elección. Elevadas tasas de resistencia a tetraciclina y macrólidos se han detectado en diversos países, siendo esta última muy elevada en países mediterráneos.

Numerosos estudios han descrito cambios en la epidemiología de las enfermedades producidas por SGA, principalmente en el Norte de Europa y América. De modo que el análisis de los cambios en la epidemiología y virulencia de las cepas circulantes son importantes para reconocer y controlar este tipo de infecciones. En España hay poca información disponible sobre la epidemiología de las cepas circulantes a nivel global. Para obtener una “fotografía” de las cepas que producen infecciones invasivas y otros cuadros clínicos en cuanto a su composición antigénica, resistencia a antimicrobianos y factores de virulencia se plantean los siguientes objetivos:

1. Tipificar las cepas de *S. pyogenes* españolas recibidas en el Centro Nacional de Microbiología entre 1994-2006, basándonos en las características antigénicas de la proteína T y la secuencia del gen *emm*.
2. Relacionar la distribución de estos tipos antigénicos y los cuadros clínicos producidos.
3. Caracterizar molecularmente los aislados mediante electroforesis en campo pulsado y correlacionar patrones obtenidos y formula antigénica.
4. Estudiar el perfil de 10 genes de toxinas implicados en la virulencia mediante PCR múltiple y analizar su relación con los serotipos y cuadros clínicos más graves.

5. Analizar la sensibilidad de las cepas a los principales antibióticos empleados en el tratamiento de las infecciones producidas por SGA.
6. Caracterizar fenotípica y molecularmente los mecanismos de resistencia a macrólidos y tetraciclina.
7. Obtener información de la cobertura vacunal en nuestro medio, en función de los tipos T y *emm* predominantes en España.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ORIGEN DE LAS CEPAS

Se han estudiado 898 cepas de *Streptococcus pyogenes* recibidas en el Laboratorio de Referencia del Servicio de Bacteriología del Centro Nacional de Microbiología (CNM) del Instituto de Salud Carlos III entre los años 1994 y 2006. Las cepas han sido enviadas por 75 laboratorios hospitalarios y centros de salud de distintas provincias españolas mostradas en la Figura 18.

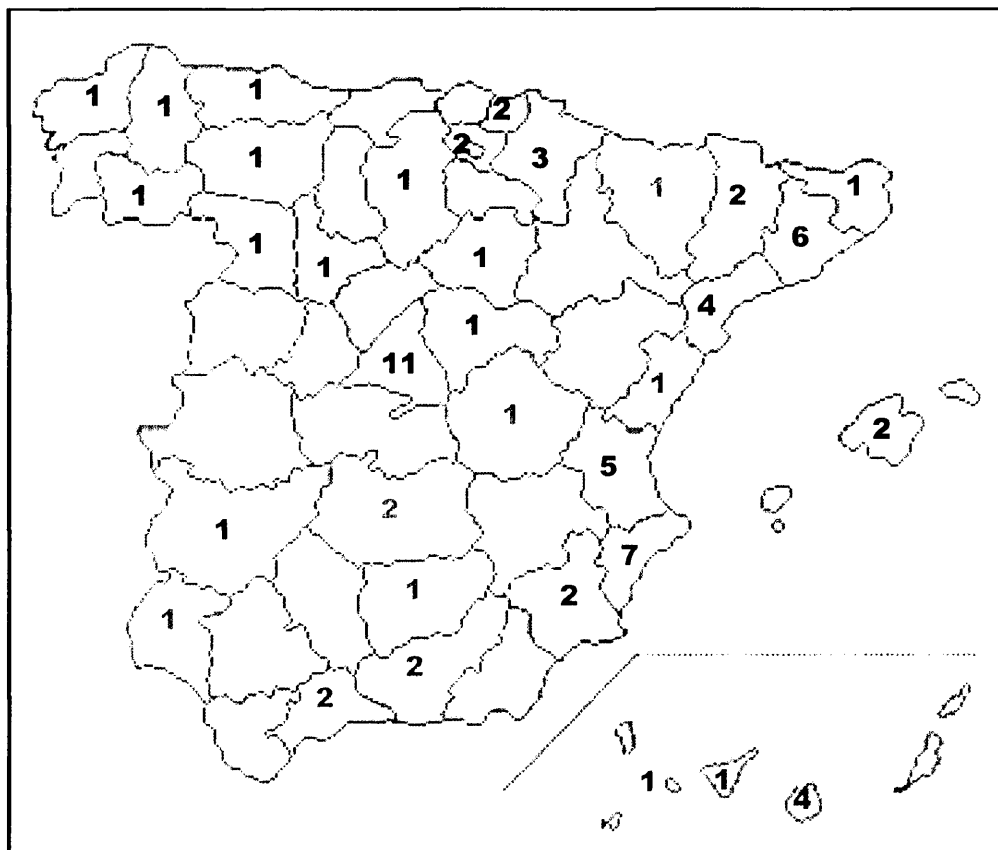


Figura 18. Distribución de los 75 laboratorios hospitalarios y centros de salud de las distintas provincias españolas que han enviado cepas de SGA al CNM entre 1994 y 2006.

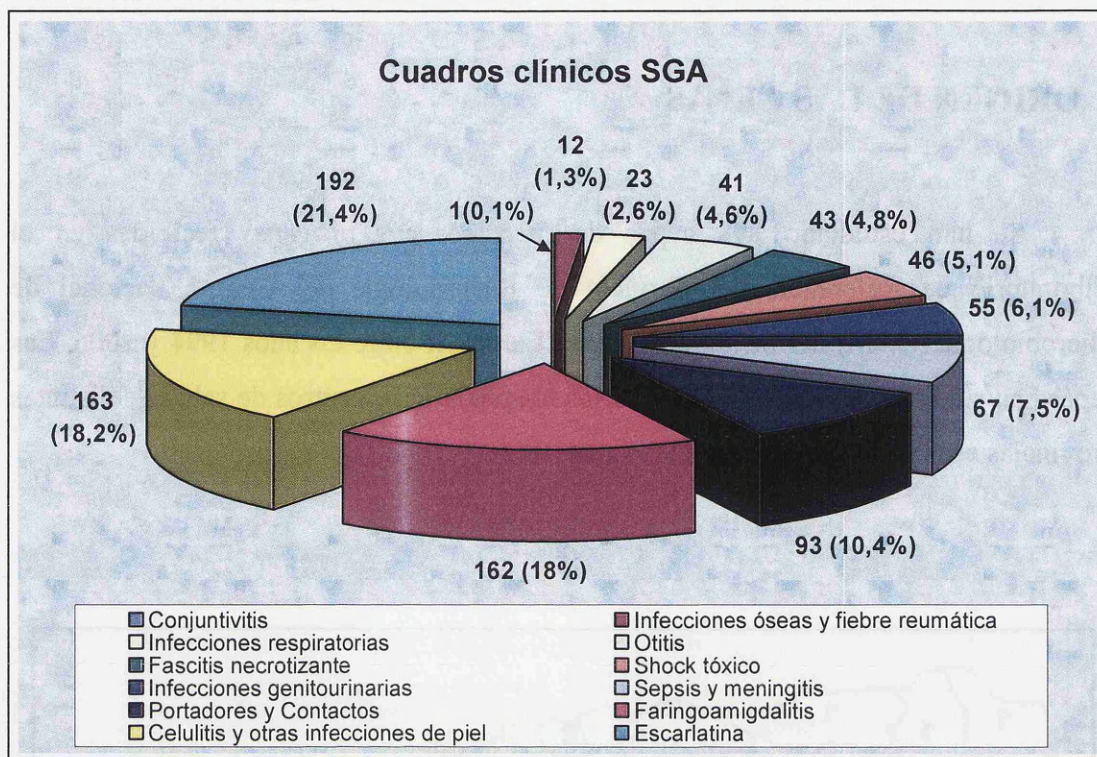


Figura 19. Cuadros clínicos producidos por cepas de *S. pyogenes* (n=898) recibidas en el CNM entre 1994 y 2006. Se indica el número de cepas registrado para cuadro clínico y entre paréntesis el porcentaje de representación frente al total.

Las cepas de SGA fueron responsables de variedad de cuadros clínicos, desde simples faringitis hasta infecciones invasivas graves como fascitis necrotizante, shock y sepsis. El amplio espectro de los cuadros clínicos producidos por SGA se muestra en la Figura 19.

Las infecciones que se incluyen en cada grupo se indican a continuación:

Celulitis e infecciones de piel: celulitis (140), eczema (1), panadizo (4), herida (7), infección picadura (2), úlcera (5), impétigo (2), erisipela (1), eritema (1).

Infecciones genitourinarias: vaginitis (39), infecciones del tracto urinario (2), úlcera genital (1), balanitis (8), endometritis (2), absceso cervical (2) y bartilinitis (1).

Infecciones respiratorias: Absceso de pulmón (1), empiema (2), derrame pleural (1) y neumonía (19).

Infecciones óseas y fiebre reumática: Artritis (3), fiebre reumática (5), osteomielitis (2) y poliartritis (2).

La escarlatina (n= 192) fue el cuadro clínico mayoritario junto con celulitis e infecciones de piel (n=163), así como la faringoamigdalitis (n=162). Entre las muestras recibidas hubo una amplia representación de enfermedades invasivas graves (17,4%) como fueron sepsis, shock tóxico y fascitis necrotizante.

Las cepas procedieron de 21 fuentes de aislamiento como se muestra en la Tabla 11. El exudado nasofaríngeo fue la principal fuente de aislamiento (50,4 %) seguido de sangre (14,5%) y piel (13,9%).

Tabla 11. Fuentes de aislamiento de las cepas de *S. pyogenes* (n=898) recibidas en el CNM entre 1994 y 2006, indicadas por orden de frecuencia.

Fuente	Nº	%
Exudado nasofaríngeo	453	50,4
Sangre	134	14,9
Piel	125	13,9
Exudado ótico	41	4,6
Exudado vaginal	40	4,5
Exudado de herida	37	4,1
Pus/Abscesos	23	2,6
Líquido pleural	13	1,4
Glande	8	0,9
LCR	7	0,8
Músculo	2	0,2
Exudado umbilical	2	0,2
Líquido articular	2	0,2
Espuito	2	0,2
Orina	2	0,2
Cepillado bronquial	2	0,2
Úlcera genital	1	0,1
Amígdala	1	0,1
Conjuntiva	1	0,1
Exudado gástrico	1	0,1
Tejido cardíaco	1	0,1
Total	898	100,0

2. IDENTIFICACIÓN DE SGA

Todas las muestras recibidas se sembraron en placas de agar columbia suplementado con 5% de sangre de oveja y se incubaron durante 18-24 horas a 37°C en CO₂ al 5%. Tras la incubación, se observó el tipo de hemólisis (Figura 20) y se realizaron las siguientes pruebas para confirmar la identificación de las cepas bacterianas:

1. **Método de aglutinación en látex** (Slidex Strepto Kit, Bio-Merieux Marcy l'Etoile, Francia).
2. Identificación de especie mediante pruebas miniaturizadas: **rapid ID 32 STREP kit** (Bio-Merieux Marcy l'Etoile, Francia) o **paneles de identificación para Gram positivos** (Biolog, Hayward CA, EEUU).

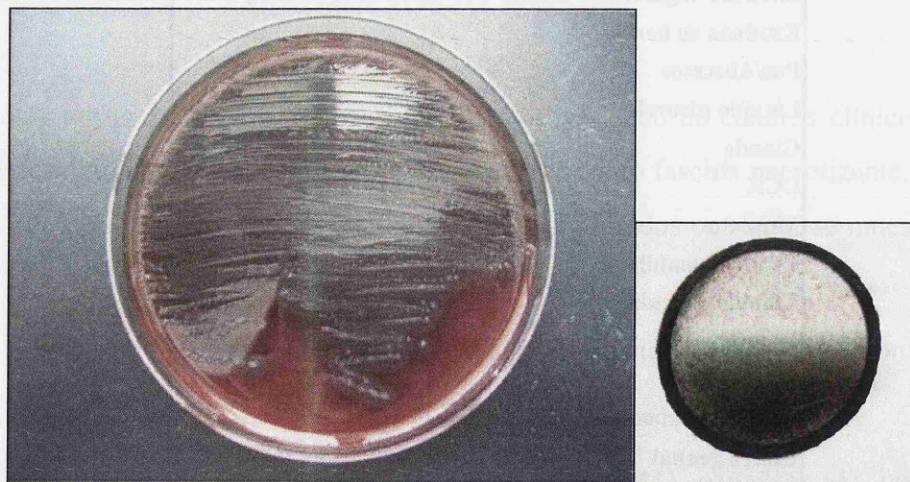


Figura 20. La figura de la izquierda muestra un cultivo de *S. pyogenes* en el que se observa β -hemólisis del agar sangre presente en el medio de cultivo de agar columbia. Derecha: Detección del grupo de Lancefield mediante el método de aglutinación en látex. Se observa una reacción positiva frente al grupo A, caracterizada por una aglutinación de las bolas de látex en color rojo frente al fondo verde.

2.1. Método de aglutinación en látex

El método de aglutinación en látex (Slidex Strepto Kit, Bio-Merieux Marcy l'Etoile, Francia) nos permite identificar los antígenos polisacáridicos específicos de grupo (Lancefield), en el caso de *S. pyogenes* es el grupo A.

Se realizó una suspensión en 0,3 ml de solución de enzima de extracción con 5 colonias del cultivo y se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se depositó 1 gota de cada suero específico de grupo en los círculos de la tarjeta de aglutinación y con una pipeta pasteur se añadió una gota del extracto bacteriano.

El contenido de cada círculo se homogeneizó con un bastoncillo mediante movimientos orbitales durante un minuto. Una reacción positiva para el grupo de Lancefiel A se manifestó con una aglutinación de las partículas de látex frente a un fondo verde (Figura 20).

2.2. Pruebas miniaturizadas

2.2.1. La galería bioquímica rapid ID 32 STREP

Rapid ID 32 STREP (Bio-Merieux Marcy l'Etoile, Francia) es un sistema de identificación rápida de estreptococos y microorganismos próximos que incluye diferentes pruebas enzimáticas estandarizadas. Está constituido por 32 cúpulas con diferentes substratos deshidratados que se muestran en la Figura 21.

Se realizó una suspensión del cultivo bacteriano en 3ml de solución salina ajustando la turbidez a un equivalente de 4McFarland. Se inocularon 55µl de la suspensión bacteriana en cada uno de los pocillos de la galería bioquímica y se incubó durante 4 horas a 37°C en aerobiosis. Posteriormente se realizó la lectura manual de las pruebas bioquímicas y se analizaron los resultados obtenidos en una base de datos específica suministrada por la casa comercial Bio-Merieux.

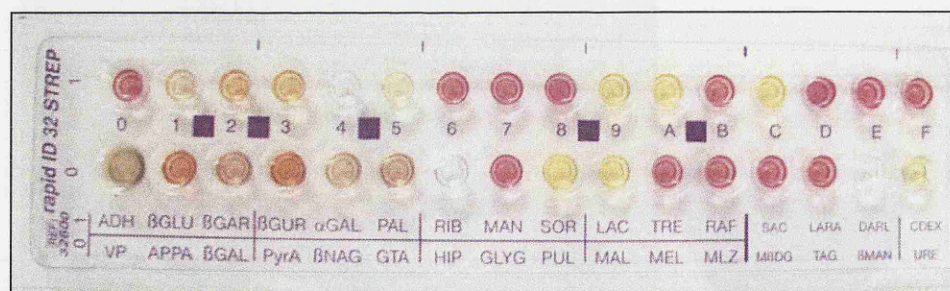


Figura 21. Galería bioquímica rapid ID 32 STREP kit de una cepa identificada como *S. pyogenes* con un 99,9% de probabilidad.

2.2.2. Paneles de identificación de Gram positivos

En las cepas cuya identificación fue dudosa mediante la metodología descrita, se recurrió a la identificación con paneles de gram positivos de Biolog (Biolog, Hayward CA, EEUU).

Los paneles de Biolog (microplacas de 96 pocillos con 95 fuentes de carbono) contienen cloruro de tetrazolium en cada pocillo, de modo que cuando el microorganismo utiliza un sustrato concreto, se reduce el compuesto anterior a formazán, de color violeta (Figura 22). Este principio permite revelar las microplacas visualmente.

Se realizó una suspensión del cultivo bacteriano en los tubos suministrados por la casa comercial (líquido de inoculación) y se depositaron 150 μ l de la suspensión bacteriana en cada uno de los pocillos de la microplaca GP2 para bacterias gram positivas. El panel se incubó a 37°C en CO₂ al 5% durante 24 horas. Posteriormente se realizó la lectura manual, siendo positivos aquellos pocillos que presentaron color violeta. Los datos obtenidos fueron analizados en la base de datos específica suministrada por la casa comercial Biolog.



Figura 22. Panel de identificación de microorganismos gram positivos de Biolog (Biolog, Hayward CA, EEUU), las fuentes de carbono usadas por SGA se observan en color violeta.

3. TIPIFICACIÓN DEL ANTÍGENO T

La tipificación del antígeno T se realizó mediante el **método de aglutinación** en porta utilizando sueros tipo-específicos (Seiken-Oxoid, Cambridge, Gran Bretaña). Se inocularon en 5 ml de caldo Todd-Hewitt varias colonias de SGA crecidas en placas de agar columbia suplementado con 5% de sangre de oveja. Se incubaron a 30°C durante toda la noche. Posteriormente se centrifugó el caldo a 3000 rpm durante 20 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 0,5 ml de caldo Todd-Hewitt al que se añadieron 4 gotas de extracto pancreático de cerdo, 1 gota de rojo fenol y 1 gota de indicador de pH, incubándose durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 3000 rpm durante 20 minutos y se resuspendió el sedimento en 0,5 ml de PBS. Esta suspensión se enfrentó con los sueros serogrupo específicos en un porta y fue positiva para los tipos T que mostraron aglutinación (Figura 23).

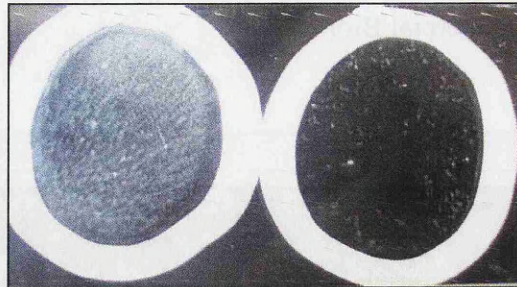


Figura 23. Tipificación del antígeno T mediante aglutinación en porta. En el círculo izquierdo se observa la aglutinación frente al suero específico T1, mientras que en el círculo derecho no se observa aglutinación para el suero específico T3.

4. TIPIFICACIÓN GEN *emm* (Proteína M)

La proteína M se determinó mediante la secuenciación de la **región terminal 5'** del gen *emm* (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/protocols.html>) para ello se realizaron los siguientes pasos:

4.1. Extracción del ADN bacteriano con cloroformo

Se realizó una suspensión del cultivo bacteriano en 300 µl de agua destilada a la que se añadieron 300 µl de cloroformo, se agitó en el vortex hasta su homogeneización. La suspensión se incubó durante 20 minutos a 80°C y posteriormente en el congelador a -20°C durante otros 20 minutos. Se centrifugó a 13000 rpm 3 minutos, obteniendo una solución con dos fases. La fase superior se traspasó a un eppendorf limpio, constituyendo el extracto de ADN que se utilizará para realizar la PCR posterior (Ausubel, 1991).

4.2. Amplificación del gen *emm*

Mediante la técnica de PCR se procedió a amplificar el gen *emm*, para ello se utilizaron cebadores específicos. Los cebadores empleados fueron *emm1* (sentido) y *emm2* (antisentido), previamente descritos por el CDC de Atlanta (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/protocols.html>). La secuencia de los mismos se muestra a continuación:

emm1: 5' TATT(C/G)GCTTAGAAAATTAA 3'

emm2: 5' GCAAGTTCTTCAGCTTGTTT 3'

La reacción de amplificación se llevó a cabo con el equipo comercial PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido). Este producto consta de viales de 0,2 ml ó 0,5 ml con una bolita liofilizada que tras su reconstitución en un volumen final de 25 µl presenta las siguientes concentraciones de compuestos: 2,5 unidades de la ADN polimerasa Taq, una concentración de cada nucleótido trifostato de 200 µM en 10mM de buffer Tris-HCl (pH 9), 50 mM de KCl y 1,5 mM de MgCl₂.

Como se ha comentado, el producto se reconstituyó en un volumen final de 25 µl que constó de agua destilada comercial (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU), cebadores específicos y extracto de ADN (apartado 4.1), las cantidades y concentraciones empleadas se indican en la Tabla 12.

Tabla 12. Componentes y cantidades empleadas en la reacción de amplificación del gen *emm* con el equipo comercial PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads.

Componente	Cantidad
Agua destilada comercial	18
<i>emm1</i> (5 picomoles/µl)	1
<i>emm2</i> (5 picomoles/µl)	1
Extracto ADN	5
Volumen final	25

Una vez preparada la mezcla de reacción se procedió a la amplificación del gen *emm* mediante PCR en el termociclador PTC-100 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Watertown, EE.UU) con el programa de amplificación indicado por el Center of Disease and Control (CDC) en la Tabla 13 (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/protocols.html>). Se usó como control negativo agua destilada y como control positivo una muestra conocida de *S. pyogenes*.

Tabla 13. Programa de amplificación del gen *emm*. (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/protocols.html>)

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	1 min	1
Desnaturalización	94°C	15 seg	
Hibridación	46°C	30 seg	10
Elongación	72°C	1 min 5seg	
Desnaturalización	94°C	15 seg	
Hibridación	46°C	30 seg	20
Elongación	72°C	1 min 15seg *	
Elongación final	72°C	10 min	1
Conservación	4°C	indefinido	1

*Incremento de 10 segundos en cada ciclo.

Posteriormente se comprobó la amplificación del gen *emm* en un gel de agarosa MS8 (Conda, Madrid, España) al 1% en TAE 1x (Figura 24). Se cargaron en cada pocillo 2 µl del producto obtenido y 2 µl de Loading Dye 6x (Roche Applied Sciences, Mannheim, Alemania). El marcador de peso molecular X 0,07-12,2 kpb (Roche Applied Sciences, Mannheim, Alemania) fue el utilizado en la electroforesis que se desarrolló durante 30 minutos a 100 voltios. El gel se tiñó con bromuro de etidio 1mg/ml durante 15 minutos y se captó la imagen con el programa Quantity One versión 4.6.1 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU).

4.3. Purificación y secuenciación del gen *emm*

Los amplicones obtenidos presentaron un tamaño entre 500 pb-1600 pb y se purificaron con el equipo ADN and Gel Band Purification (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido) según las instrucciones del fabricante. Posteriormente,

se secuenciaron con el reactivo Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU). La reacción de secuenciación se realizó con los componentes indicados en la Tabla 14 y el cebador específico *emmseq2*:

***emmseq2*: 5' TATTCGCTTAGAAAATTAAAAACAGG 3'**

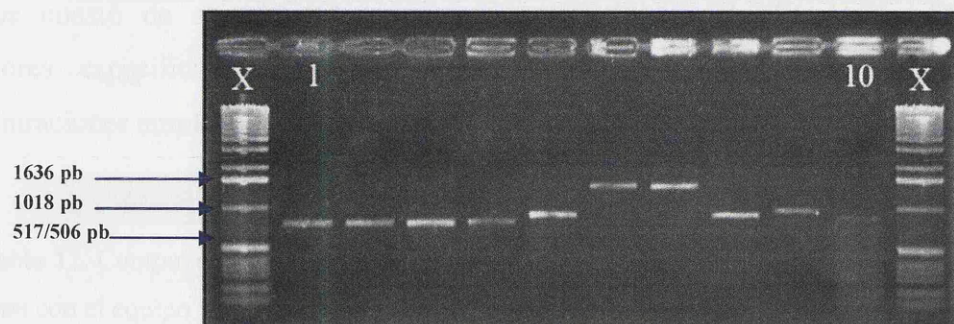


Figura 24. Gel de agarosa al 1% que muestra los amplicones (1-10) obtenidos mediante PCR de la región terminal 5' del gen *emm*. X: peso molecular X 0,07-12,2 kpb.

Tabla 14. Componentes y cantidades empleadas en la reacción de secuenciación del gen *emm* con el reactivo Big Dye Terminator V.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU).

Componentes	Volumen (µl)
Agua destilada comercial	6
Big Dye Terminator	1
<i>emmseq2</i> (5 picomoles/ µl)	1
Amplicón	2
Volumen final	10

La reacción de secuenciación se llevó a cabo en el termociclador PTC-100 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Watertown, EEUU) con el programa indicado en la Tabla 15. La secuencia de cada amplicón se obtuvo con el secuenciador automático ABI PRISM 3700 ADN Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU).

Tabla 15. Programa de secuenciación del gen *emm*. ([http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/ protocols.html](http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/protocols.html))

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	3 min	1
Desnaturalización	96°C	10 seg	25
Hibridación	55°C	5 seg	
Elongación	60°C	4 min	

4.4. Análisis de los datos

Las secuencias obtenidas se compararon con las disponibles en la base de datos del GeneBank usando el programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) a través del servidor del NCBI (National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para asignar un serotipo concreto se siguieron los criterios descritos por el CDC: comparar las primeras 160 pb del extremo 5' del gen *emm*, considerando que dos aislados comparten el mismo serotipo si su identidad es $\geq 95\%$ para las primeras 160 pb del extremo 5' (Facklam, 1999). Si este criterio no se cumple, la secuencia podría ser la de un serotipo nuevo.

5. ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO (PFGE)

La diversidad de las cepas recibidas de *S. pyogenes* se estudió mediante la técnica de electroforesis en campo pulsado. Para ello, se utilizó la metodología previamente descrita por Nguyen y cols, con algunas modificaciones.

5.1. Obtención del ADN cromosómico y lisis bacteriana

Las cepas de SGA se sembraron en placas de agar columbia suplementado con 5% de sangre de oveja y se incubaron durante 18-24 horas a 37°C en CO₂ al 5%. A partir del cultivo se realizó una suspensión bacteriana en buffer SE pH 7,5 (75 mM NaCl y 30 mM EDTA) y se midió la densidad óptica a 420 nm con el fin de ajustar la suspensión a 10⁹ ufc/ml mediante una curva de calibrado. Una vez ajustada la concentración, se tomaron 500 µl de la suspensión bacteriana y se añadieron 30 µl de mutanolisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU) con una concentración de 5000 U/ml en tampón fosfato 1M pH 6,5. Esta suspensión se mezcló a 56°C con 500 µl agarosa Megabase (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU) al 2% preparada en SE pH 7,5. Posteriormente se depositó la mezcla en unos moldes de plástico. Se dejó enfriar la agarosa, obteniendo así unos bloques de agarosa con el ADN bacteriano inmovilizado.

La lisis bacteriana se realizó sumergiendo los bloques en solución de lisis positiva pH 7,5 (6 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 1M de NaCl, 0,5 % Brij 58, 0,2 % deoxicolato sódico, 0,5 % N-lauril sarcosina) con 500 µg/ml de lisozima (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU), incubándose a 37°C durante toda la noche. Posteriormente, se introdujeron en una segunda solución de lisis negativa pH 9,5 (0,6 M EDTA y 1% N-lauril-sarcosina) con 500 µg/ml de proteinasa K (Fermentas, Vilnius, Lituania) que se incubó a 56°C durante toda la noche. Los restos de la lisis bacteriana se eliminaron mediante sucesivos lavados (al menos 5) con TE pH 7,5 (10 mM Tris-HCl y 1mM EDTA) a 4°C.

5.2. Digestión del ADN bacteriano y electroforesis

El ADN bacteriano fue digerido con la enzima de restricción *SmaI*, enzima normalmente utilizada en la digestión de estreptococos. En los casos en los que el ADN de la cepa no fue digerible con dicha enzima se recurrió a la digestión con *SfiI*.

5.2.1. *SmaI*-PFGE

El ADN cromosómico inmovilizado en los bloques de agarosa se incubó con 40U (unidades) de la enzima de restricción *SmaI* (Fermentas, Vilnius, Lituania) durante 4 horas a 30 °C y se detuvo la digestión con TE pH 7,5. Un tercio de cada uno de los bloques fue depositado en un peine de 20 pocillos, como marcador de peso molecular se utilizó el concatémero del fago lambda (Biolabs, Nueva Inglaterra, Reino Unido) como control de peso molecular. Tras colocar el peine en el molde adecuado, se vertieron 150 ml de agarosa Megabase (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU) al 1.2%. Una vez gelificado se llevó a cabo la electroforesis en campo pulsado en el aparato Cheff Mapper III (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU) mostrado en la Figura 25. El programa de electroforesis para esta enzima fue el siguiente: un pulso inicial de 0,5 segundos y un pulso final de 40 segundos, durante 22 horas a 6 V/cm con un ángulo de 120°.



Figura 25. Aparato de campo pulsado Cheff Mapper III (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU)

5.2.2. *Sfi*I-PFGE

Para las cepas no digeribles con *Sma*I se recurrió a la digestión con la enzima de restricción *Sfi*I (Fermentas, Vilnius, Lituania). En este caso la digestión se realizó con 40 U de *Sfi*I a 50°C durante toda la noche. El programa de electroforesis para *Sfi*I fue el siguiente: un pulso inicial de 20 segundos y un pulso final de 75 segundos, durante 22 horas a 6 V/cm con un ángulo de 120° (Perez-Trallero, 1999).

5.2.3. Tinción y captura de la imagen

Una vez finalizadas las electroforesis, se tiñeron los geles con bromuro de etidio 1 mg/ml durante 45 minutos y fueron desteñidos durante 2 horas con agua destilada. Posteriormente se captaron las imágenes con el programa Quantity One v4.6.1 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU).

5.3. Análisis de los perfiles electroforéticos

5.3.1. Relación filogenética

Los distintos perfiles de campo pulsado obtenidos fueron interpretados con el programa InfoQuest FP versión 4.5 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU). El análisis de los perfiles de campo pulsado se realizó con el método de agrupamiento UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic averages) (Nei, 1979), con el coeficiente de similitud de Dice y un índice de tolerancia de 1,2%.

No se consideraron las bandas inferiores 48.5 kilobases debido a una menor resolución del gel y a la probabilidad de que los fragmentos fueran ADN móvil y no propiamente genómico.

Los perfiles electroforéticos obtenidos con *Sma*I se identificaron con números arábigos según el orden de aparición en el estudio. Los perfiles similares que difirieron en 2-3 fragmentos fueron considerados como subtipos y se les asignó el mismo número de perfil

seguido de letras ordenadas alfabéticamente. En el caso de *SfiI*-PFGE, no se diferenciaron subtipos y fueron identificados con números arábigos los diferentes perfiles observados.

5.3.2. Índice de discriminación de Simpson

Se calculó el índice de discriminación de Simpson (ID) (Hunter, 1988) para el PFGE con *SmaI* y *SfiI*. El ID indica la probabilidad de que dos cepas no relacionadas, tomadas de la población analizada, se sitúen en diferentes grupos de tipificación. Está determinado por el número de tipos definido por el método aplicado y la frecuencia relativa de esos tipos. Se calculó con la siguiente ecuación:

$$ID = 1 - \left[\sum n_j (n_j - 1) / N (N - 1) \right]$$

N: número total de cepas en la muestra

S: número total de tipos descritos

n_j: número de cepas pertenecientes al tipo j

Los valores obtenidos oscilan entre 0 y 1, un valor de 1 nos indicaría que si se seleccionasen al azar en la población de estudio dos cepas no relacionadas, en el 100% de las repeticiones de la técnica de tipado, las cepas se situarían en distintos grupos de tipificación.

6. DETECCIÓN DE GENES CODIFICANTES DE TOXINAS

Se analizó la presencia o ausencia de 10 genes que codifican toxinas estreptocócicas implicadas en la virulencia del microorganismo. Los genes se amplificaron mediante una técnica de PCR múltiple aplicada en nuestro laboratorio siguiendo la metodología descrita por Schmitz y cols. (Schmitz, 2003). Los genes estudiados fueron los siguientes: *speA*, *speB*, *speC*, *speF*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *ssa* y *smeZ*. Se estudió la distribución de los diez genes en todos los cuadros clínicos y en una selección de celulitis (n=140), escarlatina (n=92) y faringoamigdalitis (n=73).

Para realizar las PCRs se utilizó el equipo comercial PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido) y los extractos de ADN mencionados en el apartado 4.1. Se desarrollaron 2 PCRS múltiples, una primera en la que se estudiaron *speB*, *speF*, *speC* y *speH*; una segunda PCR múltiple en la que se estudiaron *ssa*, *speA*, *smeZ*, *speG* y *speJ* (Schmitz, 2003). El gen *speI* fue estudiado mediante una PCR individual (Proft, 2001).

Los componentes y cantidades empleados para realizar cada una de las PCRs se indican en la Tabla 16. La secuencia de los cebadores para cada uno de los genes, así como el tamaño de los amplicones obtenidos se muestran en la Tabla 17. Las PCRs se llevaron a cabo en el termociclador PTC-100 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Watertown, EE.UU) según el programa de amplificación especificado en la Tabla 17.

Tabla 16. Componentes de las 2 PCR múltiples aplicadas en nuestro laboratorio y la PCR de *speI*. La concentración de los cebadores empleados es de 5 picomoles/ μ l.

PCR múltiple 1		PCR múltiple 2		PCR <i>speI</i>	
Componente	Volumen (μ l)	Componente	Volumen (μ l)	Componente	Volumen (μ l)
Agua destilada	0	Agua destilada	2	Agua destilada	18
<i>spe B</i> sentido	3	<i>ssa</i> sentido	2	<i>spe I</i> sentido	1
<i>spe B</i> antisentido	3	<i>ssa</i> antisentido	2	<i>spe I</i> antisentido	1
<i>spe F</i> sentido	2	<i>spe A</i> sentido	2		
<i>spe F</i> antisentido	2	<i>spe A</i> antisentido	2		
<i>spe C</i> sentido	2	<i>sme Z</i> sentido	2		
<i>spe C</i> antisentido	2	<i>sme Z</i> antisentido	2		
<i>spe H</i> sentido	3	<i>spe G</i> sentido	1		
<i>spe H</i> antisentido	3	<i>spe G</i> antisentido	1		
		<i>spe J</i> sentido	2		
		<i>spe J</i> antisentido	2		
Extracto ADN	5 μ l				
Volumen final	25 μ l				

Tabla 17. Secuencias de los cebadores usados para amplificar los diferentes genes codificantes de toxinas, así como el tamaño de los amplicones obtenidos y el programa de amplificación empleado.

Gen	Secuencia del cebador (5'→3')	Tamaño del amplicon (pb)	Programa de amplificación	Referencia
<i>spe A</i>	TTAGAACCAAGAGATGG ATTCTTGAGCAGTTACC	248	96°C/5min 96°C/50seg 44°C/65seg 72°C/70seg 72°C/5min	(Schmitz, 2003)
<i>spe B</i>	AAGAAGCAAAAGATAGC TGGTAGAAGTTACGTCC	955		
<i>spe C</i>	GATTCTACTTATTTACCC AAATATCTGATCTAGTCCC	584		
<i>spe F</i>	TACTTGGATCAAGACG GTAATTAATGGGTAGCC	782		
<i>spe G</i>	AGAACTTATTTGCCC TAGTAGCAAGGAAAAGG	155		
<i>spe H</i>	AGATTGGATATCACAGG CTATTCTCTCGTTATTGG	416		
<i>spe J</i>	ATCTTTCATGGGTACG TTTCATGTTTATTGCC	535		
<i>ssa</i>	GTGTAGAATTGAGGTAATTG TAATATAGCCTGTCTCGTAC	706		
<i>sme Z</i>	TAACTCCTGAAAAGAGGCT CATTGGTTCTTCTTGATAAG	391		
<i>spe I</i>	ATGAGTAGTGTGGGAGTTATTAA TTATTATTAAATTTAACTAAG	678		(Proft, 2001)

Se utilizó agua destilada como control negativo y un extracto de ADN de *S. pyogenes* conocido como control positivo. Los productos de PCR obtenidos en cada una de las PCR múltiples se cargaron en un gel de agarosa MS8 (Conda, Madrid, España) al 2% en TAE 1X. En cada pocillo se depositaron 10 µl del producto de PCR y 5 µl de Loading Dye 6x (Roche Applied Sciences, Mannheim, Alemania), en los extremos se incluyó el patrón de peso molecular de 100-1000 pb (Fermentas, Vilnius, Lituania). La electroforesis se llevó a cabo durante 80 minutos a 100 voltios.

La tinción se realizó con bromuro de etidio 1 mg/ml durante 30 minutos y la captación de la imagen con el programa Quantity One versión 4.6.1. (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU). En función de los diferentes tamaños de peso molecular obtenidos en el gel de agarosa se determinó el perfil toxigénico de cada una de las cepas estudiadas. En la Figura 26 y Figura 27 se muestran las fotografías obtenidas para cada una de las PCRs múltiples.

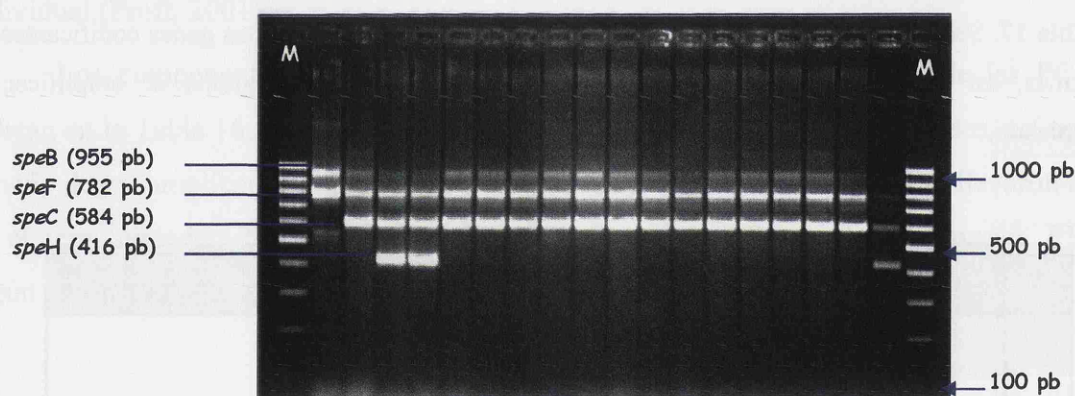


Figura 26. Gel de agarosa al 2% obtenido para la primera PCR múltiple. En los pocillos de los extremos se sitúa el marcador de 100-1000 pb, el resto de los pocillos son diferentes muestras de SGA donde se observan los amplicones obtenidos: *speB* (955pb), *speF* (782pb), *speC* (584pb) y *speH* (416pb).

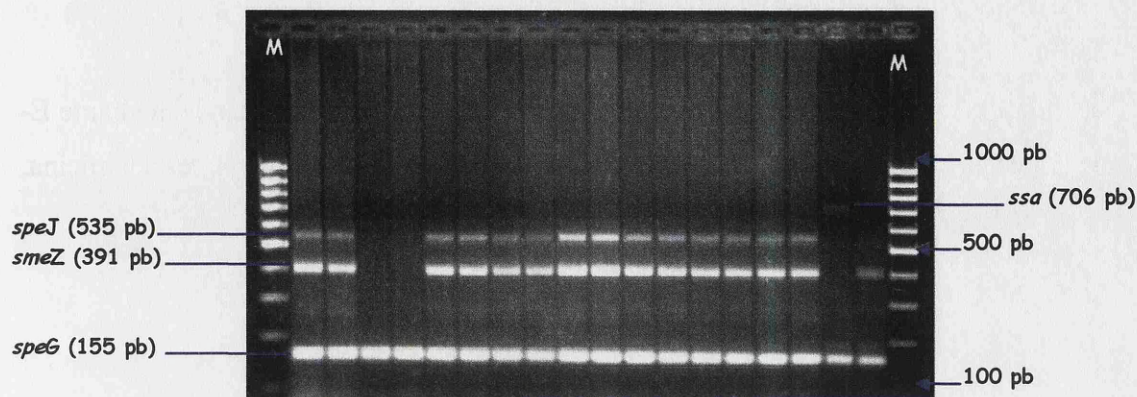


Figura 27. Gel de agarosa al 2% obtenido para la segunda PCR múltiple. En los pocillos de los extremos se sitúa el marcador de 100-1000 pb, el resto de los pocillos son diferentes muestras de SGA donde se observan los amplicones obtenidos: *ssa* (706 pb), *speJ* (535 pb), *smeZ* (391 pb) y *speG* (155 pb).

La electroforesis del producto obtenido para *speI* se realizó en la cubeta rápida Mother E-base (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU), para ello se cargó en cada pocillo 3 μ l de producto, 15 μ l de agua destilada y 2 μ l de de Loading Dye 6x (Roche Applied Sciences, Mannheim, Alemania). La electroforesis se llevó a cabo durante 6 minutos con el programa EG. Este gel es preteñido, de modo que se captó la imagen directamente con el programa Quantity One versión 4.6.1. (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU).

7. SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

Se estudió la sensibilidad de las cepas de *S. pyogenes* a 6 antimicrobianos mediante E-test (AB BIODISK, Solna, Suecia): penicilina, vancomicina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina y rifampicina (Figura 28).

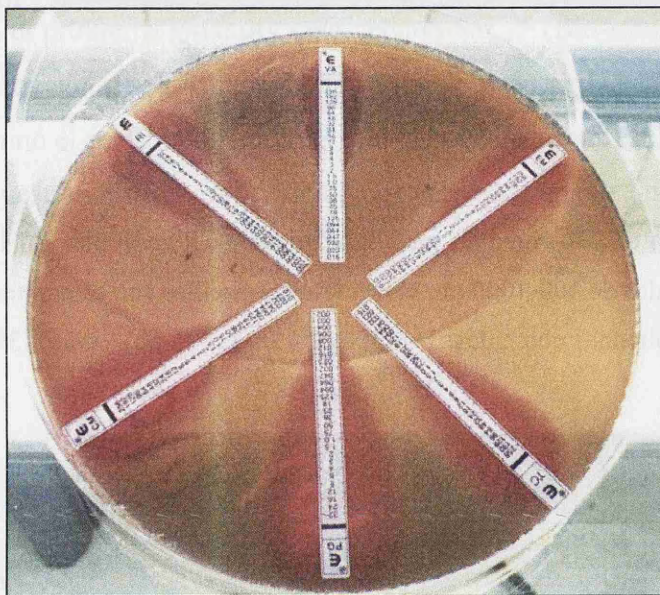


Figura 28. Antibiograma de SGA mediante E-test para los 6 antimicrobianos estudiados.

A partir de una suspensión 0,5 McFarland del cultivo bacteriano se inoculó uniformemente una placa de 150 mm de agar Mueller-Hinton suplementado con 5% de sangre de oveja. Posteriormente se depositaron las 6 tiras de antibiótico sobre la superficie de la placa separadas entre si una distancia suficiente para que no interfirieran. La placa se incubó a 37°C con un 5% de CO₂ durante 24 horas. La lectura de los antibiogramas se realizó usando los criterios de sensibilidad del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005) indicados en la Tabla 18.

Tabla 18. Rango de concentraciones de los E-test y puntos de corte de resistencia según el CLSI (CLSI, 2005).

Antibiótico	Rango de concentración (µg)	Punto de corte
Penicilina	(0,02-32)	-
Vancomicina	(0,016-256)	-
Eritromicina	(0,016-256)	≥1
Clindamicina	(0,016-256)	≥1
Tetraciclina	(0,016-256)	≥8
Rifampicina	(0,002-32)	≥4

8. CARACTERIZACIÓN DE CEPAS RESISTENTES A MACRÓLIDOS

8.1. Caracterización fenotípica de cepas resistentes a macrólidos

Las cepas cuya concentración mínima inhibitoria fue mayor o igual a uno se consideraron resistentes a eritromicina. En estas cepas se procedió a identificar el fenotipo de resistencia a macrólidos según el método de doble difusión en disco descrito por Seppälä y cols (Seppälä, 1993).

Se inoculó uniformemente una placa de 90 mm de agar Mueller-Hinton suplementado con 5% de sangre de oveja con una suspensión 0,5 McFarland del cultivo bacteriano. Se depositaron discos de eritromicina (15 µg) y clindamicina (2 µg) (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, EEUU) sobre la superficie de la placa separados entre sí 15-20 mm. La placa se incubó durante 18-24 h a 37°C en 5% de CO₂.

Tras la incubación se pudieron diferenciar tres tipos de fenotipos: **MLS_b c** (resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B constitutiva), **MLS_b i** (resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B inducible) o **fenotipo M** (resistencia a macrólidos sin inducción de resistencia a clindamicina) (Fiebelkorn, 2003; Giovanetti, 1999; Seppälä, 1993).

El fenotipo **MLS_b c** es resistente a eritromicina y clindamicina. En las placas sembradas con los discos de antibióticos no aparece halo alrededor de los mismos o el halo es muy pequeño debido a la resistencia, estos halos son redondeados.

Las cepas con fenotipo **MLS_b i** son resistentes a eritromicina pero no a clindamicina. Al observar las placas con los dos discos antibióticos se observa que el halo de clindamicina que está junto a la eritromicina está despuntado (D), esto indica que la presencia de eritromicina induce resistencia a clindamicina permitiendo el crecimiento del microorganismo en esta zona.

Las cepas con **fenotipo M** al igual que en el caso anterior son resistentes a eritromicina y sensibles a clindamicina. Se distinguen del anterior porque no se induce resistencia a clindamicina y por tanto, no hay inhibición del halo alrededor del disco de clindamicina.

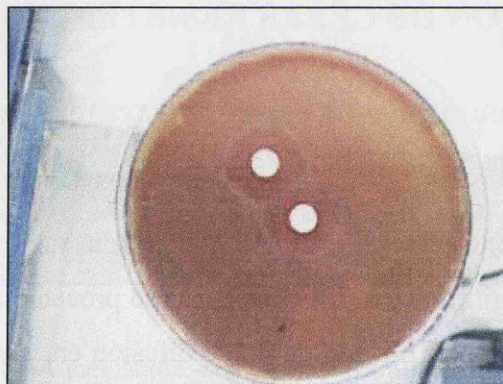


Figura 29. Placa de Muller-Hinton en la que se observa el fenotipo M de resistencia a macrólidos. Arriba está situado el disco de eritromicina y abajo el de clindamicina.

8.2. Detección de genes de resistencia a macrólidos

Se estudiaron 4 genes de resistencia a macrólidos mediante PCR: *erm*(B), *erm* (TR), *msr*(D) y *mef*(A/E) (Luthje y Schwarz, S., 2007; Malhotra-Kumar, 2005; Seppala, 1998; Sutcliffe, 1996). A partir del extracto de ADN obtenido como en el apartado 4.1, se procedió a realizar PCRs individuales para cada uno de los genes.

La reacción de amplificación se llevó a cabo con el equipo comercial PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido) con la cantidades indicadas en la Tabla 19, en el termociclador PTC-100 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Watertown, EE.UU). Los cebadores específicos de cada gen y el programa concreto de amplificación se indican en la Tabla 20. Se usaron controles positivos para todas las PCRs y como control negativo agua.

Tabla 19. Componentes y cantidades empleadas en la amplificación de los genes de resistencia a macrólidos con el equipo comercial PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads. Los cebadores utilizados fueron específicos para cada uno de los genes estudiados.

Agua destilada comercial	18
Cebador sentido (5 picomoles/ μ l)	1
Cebador antisentido (5 picomoles/ μ l)	1
Extracto ADN	5
Volumen final	25

Tabla 20. Secuencias de los cebadores utilizados en la amplificación de los genes de resistencia a macrólidos, tamaño del amplicón obtenido y programa de amplificación.

<i>erm(B)</i>	GAAAAGGTACTCAACCAAATA AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	639	95°C/5min 95°C/1min 55°C/1 min 72°C/1 min 72°C/10min	x35 Sutcliffe, 1996
<i>erm(TR)</i>	ACAGAAAAACCCGAAAAATAC TTGGATAATTATCAAGATCAG	731	93°C/3min 93°C/1min 54°C/1 min 72°C/1 min 72°C/10min	x35 Seppala, 1998
<i>msr(D)</i>	CCTTATCGGCACAGGTTTCAT GCCTTCGGAGCTCCTACTT	456	95°C/5min 95°C/1min 50°C/1 min 72°C/1 min 72°C/10min	x35 Luthje, 2007
<i>mef(A/E)</i>	CAATATGGGCAGGGCAAG AAGCTGTTCGAATGCTACGG	317	93°C/3min 93°C/1min 62°C/1 min 65°C/4 min 65°C/3 min	x30 Malhotra-Kumar, 2005

La electroforesis de los productos de PCR se realizó en la cubeta rápida Mother E-base (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU), en un E-gel 96 al 2% (Figura 30). Se cargaron 3 µl producto, 15 µl agua y 2 µl de Loading Dye 6x (Roche Applied Sciences, Mannheim, Alemania) en cada uno de los pocillos. Se usó el marcador de peso molecular X 0,07-12,2 kbp (Roche Applied Sciences, Mannheim, Alemania). La electroforesis se llevó a cabo con el programa EG durante 6 minutos. Este gel es preteñido, de modo que se captó la imagen directamente con el programa Quantity One versión 4.6.1 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU).

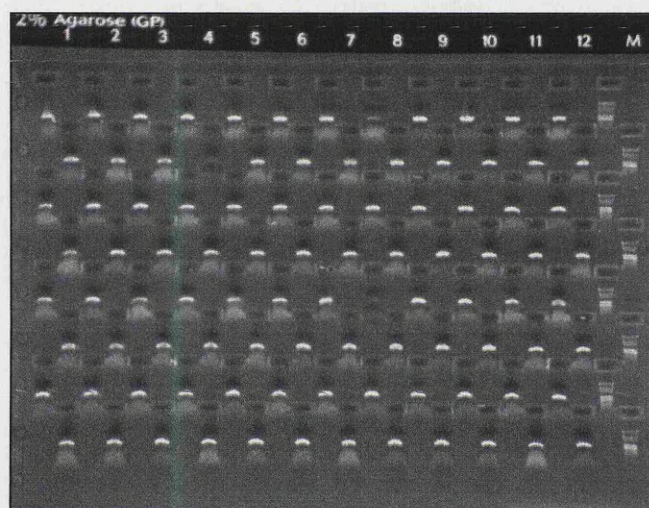


Figura 30. Imagen de un E-gel 96 al 2% en el que se observan los amplicones obtenidos para el gen *mef(A/E)* en diferentes muestras de SGA analizadas. En el pocillo M se sitúa el marcador de peso molecular X 0,07-12,2 kbp mientras que en el pocillo 12 se observan los controles de *mef(A/E)*.

9. DETECCIÓN GENES DE RESISTENCIA A TETRACICLINA

Se estudiaron mediante PCR dos genes de resistencia a tetraciclina: *tet(M)* y *tet(O)* (Malhotra-Kumar, 2005). El proceso de amplificación y visualización de los genes de resistencia a tetraciclina se realizó del mismo modo que para los genes de resistencia a macrólidos, con los cebadores y programas especificados en la Tabla 21.

Tabla 21. Cebadores y programas utilizados en la amplificación de los genes de resistencia a tetraciclina.

	Cebador	Tamaño	Programa	Referencia
<i>tet(M)</i>	GTGGACAAAGGTACAACGAG CGGTAAAGTTCGTACACAC	406	93°C/3min 93°C/1min 62°C/1 min 65°C/4 min 65°C/3 min	Malhotra-Kumar, 2005
<i>tet(O)</i>	AACTTAGGCATTCTGGCTCAC TCCCACTGTTCCATATCGTCA	515	x30	

10. DETECCIÓN GENES DE RESISTENCIA A RIFAMPICINA

En las cepas resistentes a rifampicina se procedió a secuenciar el gen *rpoB* con el fin de detectar las mutaciones asociadas con la resistencia. De modo que se secuenciaron 3 cepas resistentes a rifampicina identificadas y 2 susceptibles a este antibiótico, con el objetivo de comparar posibles mutaciones implicadas en el mecanismo de resistencia.

10.1. Extracción del ADN bacteriano con cloroformo

Se extrae el ADN bacteriano como se indicó en el apartado 4.1. (Ausubel, 1991).

10.2. Amplificación del gen *rpoB*

A partir del extracto de ADN se procedió a amplificar el gen *rpoB* mediante PCR con el equipo PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido) en el termociclador PTC-100 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Watertown, EE.UU). Las cantidades empleadas son las indicadas en la Tabla 19 como en el caso de macrólidos y tetraciclina, con los cebadores específicos para *rpoB* y el programa de amplificación indicados en la Tabla 22.

Tabla 22. Cebadores y programa de amplificación específico del gen *rpoB* (Herrera, 2002).

<i>rpoB</i>	CCGCATCGGTCTTGCTCGTATG GCCTGAGTCATGGGCAGC	753	95°C/5min 95°C/1min 60°C/1 min x30 72°C/1 min 72°C/10min	94°C/3min 96°C/10seg 60°C/4min x25 5 seg	Herrera, 2002

Posteriormente se comprobó la amplificación del gen *rpoB* en un gel de agarosa MS8 (Conda, Madrid, España) al 1% en TAE 1x, se cargaron en cada pocillo 2µl del producto obtenido y 2µl de Loading Dye 6x (Roche Applied Sciences, Mannheim, Alemania). El marcador de peso molecular X 0.07-12.2 kbp (Roche Applied Sciences, Mannheim, Alemania) fue el utilizado en la electroforesis que se desarrolló durante 30 minutos a 100 voltios. El gel se tiñó con bromuro de etidio 1mg/ml durante 15 minutos y se captó la imagen con el programa Quantity One v4.6.1 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU).

10.3. Purificación y secuenciación del gen *rpoB*

El amplicón obtenido se purificó con el equipo ADN and Gel Band Purification (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido) y se secuenció con el reactivo Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU), para ello se preparó la reacción de secuenciación con los componentes indicados en la Tabla 23.

La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un sentido en el termociclador PTC-100 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Watertown, EEUU) con el programa indicado en Tabla 22. La secuencia de cada amplicón se obtuvo con el secuenciador automático ABI PRISM 3700 ADN Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU).

Tabla 23. Componentes y cantidades empleadas en la reacción de secuenciación del gen *rpoB*.

	Volumen (μl)
Agua destilada comercial	6
Big Dye Terminator	1
<i>rpoB</i> sentido (5 picomoles/ μl)	1
Amplicón	2
Volumen final	10

10.4. Análisis de las secuencias obtenidas

El análisis de las secuencias se realizó con el paquete informático DNASTar (DNASTar, Inc., Madison, EEUU) y el visor de cromatogramas Chromas (Chromas 2.0 beta 3. Technelysium). Con estos programas se compararon las secuencias obtenidas para las cepas susceptibles a rifampicina con las secuencias de las cepas resistentes, identificando cambios a nivel de ADN. Posteriormente se analizó si estos cambios produjeron algún efecto a nivel proteico, produciendo algún cambio aminoacídico.

RESULTADOS

1. IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS

Las 898 cepas de *Streptococcus pyogenes* recibidas en CNM fueron β -hemolíticas y presentaron el antígeno del grupo A de Lancefield. La galería bioquímica rapid ID 32 STREP y los paneles para la identificación de microorganismos gram positivos confirmaron que las cepas recibidas eran *S. pyogenes* con valores $\geq 98\%$ de probabilidad.

2. VARIABILIDAD ANTIGÉNICA DE *S. pyogenes*

2.1. Tipos T

Se identificaron 16 antígenos T (Tabla 24), siendo los más frecuentes T28 (17,6%), T4 (15,3%) y T1 (14,4%). Los cinco primeros antígenos T agruparon el 64% de las cepas de SGA. El 7,1% (64) de las cepas estudiadas no fueron tipables (NT) mediante la técnica de aglutinación en porta.

Tabla 24. Distribución por orden de frecuencia de los antígenos T identificados en las 898 cepas de *S. pyogenes* recibidas en el CNM entre 1994 y 2006.

28	158	17,6
4	137	15,3
1	129	14,4
12	83	9,2
6	67	7,5
NT	64	7,1
11	57	6,3
25	52	5,8
2	41	4,6
9	27	3,0
3	26	2,9
5/27/44	21	2,3
13	19	2,1
B3264	9	1,0
3/13	6	0,7
18	1	0,1
14/49	1	0,1

2.2. Tipos M (gen *emm*)

Los genes *emm* identificados en las cepas de SGA se muestran en Tabla 25.

Se identificaron 39 tipos de los 124 descritos hasta el momento. Los seis primeros engloban el 61,75% de SGA, destacando *emm4* (15,3%), *emm1* (14,4%), *emm28* (8,9%), *emm3* (8,0%), *emm12* (7,7%) y *emm6* (7,5%).

Entre los tipos M encontrados, 14/39 se identificaron en una única cepa, mientras que otros 6 tipos los presentaron entre 2 y 5 cepas. Únicamente una cepa no fue tipable (NT) mediante esta técnica.

Tabla 25. Distribución por orden de frecuencia de los genes *emm* identificados en las 898 cepas de *S. pyogenes* recibidas en el CNM entre 1994 y 2006.

4	137	15,3	18	4
1	129	14,4	79	3
28	80	8,9	50	2
3	72	8,0	62	2
12	69	7,7	94/13	2
6	67	7,5	5	1
87	50	5,6	29	1
75	46	5,1	33	1
2	41	4,6	36	1
77	31	3,5	48	1
78	30	3,3	63	1
9	27	3,0	64	1
11	24	2,7	71	1
44	20	2,2	81	1
22	13	1,4	83	1
73	11	1,2	88	1
58	6	0,7	92	1
84	6	0,7	31/13	1
89	6	0,7	64/52	1
60	5	0,6	NT	1

2.3. Fórmula antigénica de SGA

El estudio de los genes *emm* y los antígenos T establece la fórmula antigénica que caracteriza las cepas de SGA. Como se comentó en la introducción, el gen *emm* puede presentar diferentes combinaciones con antígenos T. Así de los 16 antígenos T y los 39 tipos *emm* detectados, obtuvimos 48 combinaciones antigénicas definitivas mostradas en la Tabla 26.

Tabla 26. Distribución por orden de frecuencia de 48 combinaciones *emm* -T de SGA.

4	4	137	15,3	73	13	11	29	NT	1
1	1	129	14,4	77	13	7	33	13	1
28	28	78	8,7	58	NT	6	36	NT	1
12	12	68	7,6	84	25	6	48	28	1
6	6	67	7,5	89	B3264	6	63	NT	1
87	28	50	5,6	3	3/13	5	64	NT	1
75	25	46	5,1	60	28	5	71	NT	1
2	2	41	4,6	18	NT	3	77	14/49	1
3	NT	41	4,6	79	11	3	81	B3264	1
78	11	30	3,3	28	NT	2	83	NT	1
9	9	27	3,0	50	NT	2	88	28	1
3	3	26	2,9	62	12	2	92	NT	1
11	11	24	2,7	94/13	B3264	2	31/13	NT	1
77	28	23	2,6	5	5/27/44	1	64/52	3/13	1
44	5/27/44	20	2,2	12	NT	1	NT	NT	1
22	12	13	1,4	18	18	1	Total		898

Las combinaciones más frecuentemente observadas fueron: *emm*4T4 (15,3%), *emm*1T1 (14,4%), *emm*28T28 (8,7%), *emm*12T12 (7,6%) y *emm*6T6 (7,5%). Estas cinco combinaciones supusieron el 53,5% de la población estudiada. Este porcentaje aumenta hasta un 76,7% incluyendo las cinco combinaciones siguientes.

El 50% (24) de las combinaciones *emm*-T identificadas fueron poco frecuentes en SGA, observando entre 1 y 3 cepas. Así 18/48 combinaciones antigénicas presentaron 1 cepa mientras que en las 6 combinaciones restantes se observaron de 2 a 3 cepas.

Determinados serotipos T se asocian con un único tipo *emm* como es el caso de: *emm*4T4, *emm*1T1, *emm*6T6, *emm*2T2, *emm*9T9 ó *emm*3T3. Sin embargo, algunos tipos T se asociaron a más de un tipo *emm*: (*emm*28T28, *emm*87T28, *emm*77T28, *emm*60T28); (*emm*12T12, *emm*22T12, *emm*62T12); (*emm*75T25, *emm*84T25); (*emm*89TB3264, *emm*94/13TB3264, *emm*81TB3264); (*emm*73T13, *emm*77T13, *emm*33T13); (*emm*3T3/13, *emm*64/52T3/13); (*emm*44T5/27/44, *emm*5T5/27/44).

Es menos frecuente la asociación de un mismo tipo *emm* y varios tipos T: (*emm*77T28, *emm*77T13, *emm*77T14/49); (*emm*3T3, *emm*3T3/13).

Por otro lado, un número pequeño de cepas fueron no tipables para el antígeno T y mostraron una gran variedad de tipos *emm*, este hecho se da principalmente en cepas con baja incidencia.

Mención a parte merecen las cepas de las combinaciones *emm*3T3, *emm*3TNT y *emm*3T3/13, las cuales como veremos más adelante podríamos decir que se trata de un clon, ya que todas presentan el mismo patrón de campo pulsado. De modo que en un número importante de cepas no se detecta o no se expresa el antígeno T.

3. FÓRMULA ANTIGÉNICA Y CUADRO CLÍNICO

La correlación entre fórmula antigénica y cuadro clínico se muestra en la Tabla 27.

Se observó una cierta asociación entre algunos serotipos y determinados grupos clínicos. Así, el serotipo *emm1T1* fue predominante en los cuadros clínicos de: fascitis necrotizante (44,2%), shock tóxico (41,3%), sepsis (26,9%), infecciones respiratorias (65,2%) y otitis (31,7%).

El serotipo *emm4T4* fue el mayoritario en el caso de la escarlatina (28,6%) y fue el segundo más frecuente en cepas aisladas de casos de shock tóxico (23,9%) y sepsis (11,9%). En celulitis e infecciones de piel, *emm28T28* (27%) y *emm2T2* (12,3%) fueron los serotipos predominantes.

En el caso de faringoamigdalitis 4 serotipos fueron los más abundantes: *emm75T25* (20,4%), *emm4T4* (14,2%), *emm12T12* (12,3%) y *emm87T28* (10,5%). En portadores, *emm6T6* (26,9%) y *emm4T4* (19,4%) fueron los mayoritarios.

Las cepas responsables de escarlatina destacaron en los serotipos: *emm3TNT* (46,0%), *emm9T9* (50,0%) y *emm44T5/27/44* (60,0%). En el caso del serotipo *emm87T28* se observó que las cepas aisladas de escarlatina (44,0%) y de faringoamigdalitis (34,0%) fueron muy abundantes, mientras que en *emm77T28* (73,9%) predominaron las cepas aisladas de celulitis e infecciones de piel.

Abreviaturas tabla 27: *emm*: gen *emm*; T: antígeno T; Fas: fascitis necrotizante; Sho: shock tóxico; Cel: celulitis e infecciones de piel; Sep: sepsis; Resp: infecciones respiratorias; Ósea: infecciones óseas; Gen: infecciones genitales; Ot: otitis; Con: conjuntivitis; Esc: escarlatina; F/A: faringoamigdalitis; Por: Portadores y contactos.

Tabla 27. Correlación de la fórmula antigénica y los cuadros clínicos producidos por SGA. En gris se resaltan los resultados más destacados.

1	1	19	19	9	18	15		2	13		15	10	9	129
2	2			20	1			4			10	2	4	41
3	3	1	1	2	3	1	4	1			9	2	2	26
3	3/13	1			1			1			1	1		5
3	NT	1		3	2			3	3		19	5	5	41
4	4	2	11	12	8		1	3	4		55	23	18	137
5	5/27/44				1									1
6	6	5		5	3	2	2	4	6		7	8	25	67
9	9			5					1		14	7		27
11	11			3	2			3	2		3	7	4	24
12	12	2	3	14	3	3		4	4		11	20	4	68
12	NT												1	1
18	NT	2				1								3
18	18		1											1
22	12	1	2	2		1					2	4	1	13
28	28	1	2	44	6		2	6	2		1	9	5	78
28	NT			1				1						2
29	NT			1										1
33	13				1									1
36	NT				1									1
44	5/27/44	1			1		1	2	1		12	2		20
48	28							1						1
50	NT	1						1						2
58	NT			2						1	2	1		6
60	28			2	2						1			5
62	12											1	1	2
63	NT			1										1
64	NT	1												1
71	NT		1											1
73	13		1	5				3			1	1		11
75	25			2	2			1	2		3	33	3	46
77	28			17	1			1	2			2		23
77	13			2	1						1	1	2	7
77	14/49			1										1
78	11	5	3	3	3		2	7	1		2	1	3	30
79	11				3									3
81	B3264											1		1
83	NT							1						1
84	25			1				2				3		6
87	28		2	1				3			22	17	5	50
88	28											1		1
89	B3264			2	1			1			1		1	6
92	NT			1										1
31/13	NT			1										1
64/52	3/13				1									1
94/13	B3264			1	1									2
NT	NT				1									1
Total		43	46	163	67	23	12	55	41	1	192	162	93	898

4. ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO DE CEPAS DE SGA

4.1. Análisis mediante *Sma*I-PFGE

Las 898 cepas de SGA fueron caracterizadas mediante PFGE con la enzima de restricción *Sma*I. 681 fueron digeribles mientras que 217 cepas (24,2 %) no fueron digeribles (ND) con esta enzima. Las cepas digeribles produjeron un total de 80 pulsotipos indicados en la Tabla 28, entre los que se identificaron 11 subtipos según los criterios de Tenover (Tenover, 1995). Los patrones de restricción presentaron entre 5-16 bandas, cuyos rangos de peso molecular oscilaron entre 48,5 y 582 Kb. Los perfiles con fragmentos de 7, 8 y 9 bandas fueron los más frecuentes, presentándolos el 14,1%, 30,9% y 22,7% de las cepas estudiadas, respectivamente. En la Figura 31 se muestra un gel de campo pulsado obtenido con *Sma*I.

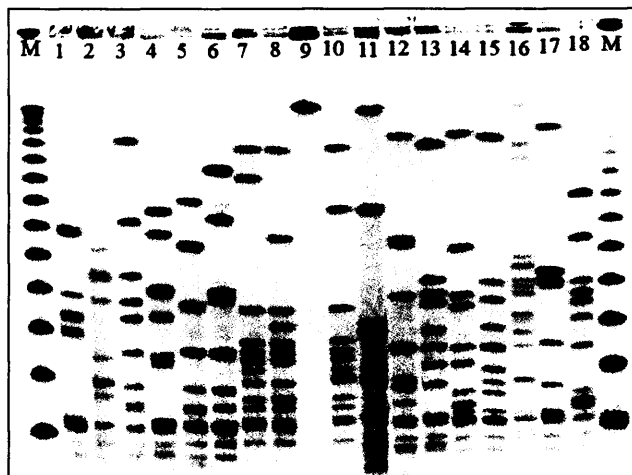


Figura 31. Electroforesis en campo pulsado de cepas de *S. pyogenes* digeridas con la enzima de restricción *Sma*I. Se muestran diferentes perfiles de campo pulsado del carril 1-18: 2b, 5a, 6, 10a, 11, 12, 21, 22, ND, 26, 28, 40, 44, 47, 48, 49, 57 y 58. M: concatémero del fago lambda.

Tabla 28. Pulsotipos y subtipos de 681 cepas de SGA digeribles con *Sma*I. Se indica la fórmula antigénica para cada pulsotipo y el número de cepas que lo presentaron. Se resaltan en gris los resultados más destacados.

1	12	12	49
2a	78	11	15
2b	78	11	3
2c	78	11	11
3	4	4	15
4	6	6	6
5a	28	28	19
5b	28	28	10
5c	28	28	3
5d	28	28	10
5e	28	28	2
5f	88	28	1
6	2	2	22
7	78	11	1
8	73	13	6
9	6	6	1
10a	77	28	6
10b	77	28	17
11	4	4	6
12	22	12	5
13	9	9	25
14	28	28	1
	3	3	26
15	3	3/13	4
	3	NT	40
16	18	NT	3
17	11	11	17
18	28	28	1
19	44	5/27/44	20
20	1	1	122
21	6	6	2

22	6	6	16
23	2	2	8
24	2	2	9
25	12	12	1
26	6	6	15
27	71	NT	1
28	58	NT	1
29	94/13	B3264	2
30	62	12	2
31	77	13	7
32	28	NT	1
33	22	12	1
34	22	12	2
35	77	14/49	1
36	11	11	1
37	28	28	2
38	NT	NT	1
39	60	28	1
40	2	2	2
41	1	1	3
42	50	NT	1
43	64	NT	1
44	92	NT	1
45	83	NT	1
46	58	NT	1
47	73	13	4
48	75	25	2
49	9	9	1
50	9	9	1
51a	28	28	16
51b	28	28	11

51c	28	28	3
52	12	12	2
53	63	NT	1
54	36	NT	1
55	87	28	9
56	22	12	4
57	60	28	3
58	58	NT	2
59	33	13	1
60	89	B3264	4
61	60	28	1
62	3	NT	1
62	3	3/13	1
63	64/52	3/13	1
64	11	11	6
65	50	NT	1
66	87	28	1
67	89	B3264	1
68	18	18	1
69	73	13	1
70	89	B3264	1
71	75	25	1
72	58	NT	2
73	87	28	1
74	22	12	1
75	31/13	NT	1
76	87	28	38
77	5	5/27/44	1
78	29	NT	1
79	79	11	3
80	48	28	1

Los pulsotipos se indican con números arábigos y los subtipos están seguidos por letras ordenadas alfabéticamente. NT: cepa no tipable.

Los patrones de restricción más frecuentemente obtenidos con *Sma*I fueron (Tabla 29): *Sma*20 *emm*1T1 (n=122), *Sma*15 *emm*3T(3-3/13-NT)(n=70), *Sma*1 *emm*12T12 (n=49), *Sma*76 *emm*87T28 (n=38), *Sma*13 *emm*9T9 (n=25), *Sma*6 *emm*2T2 (n=22) y *Sma*19 *emm*44T5/27/44 (n=20). Estos pulsotipos suponen el 30,2 % de los SGA digeribles con *Sma*I. Este valor aumenta hasta un 48,8% al tener en cuenta los subtipos *Sma*5a-5f (n=45), *Sma*51a-51c (n=30), *Sma* 2a-2c (n=29) y *Sma*10a-10b (n=23) cuya similitud es mayor de un 80% para cada uno de los grupos.

Tabla 29. Pulsotipos *Sma*I más frecuentes entre las cepas de SGA, indicados por orden de frecuencia.

20	1	1	122	
	3	3	26	
15	3	3/13	4	70
	3	NT	40	
1	12	12	49	
5a	28	28	19	
5b	28	28	10	
5c	28	28	3	45
5d	28	28	10	
5e	28	28	2	
5f	88	28	1	
76	87	28	38	
2a	78	11	15	
2b	78	11	3	29
2c	78	11	11	
13	9	9	25	
10a	77	28	6	23
10b	77	28	17	
6	2	2	22	
19	44	5/27/44	20	

Como era de esperar los patrones mayoritarios corresponden a los originados por los serotipos predominantes, ya que se observó una asociación entre el patrón de campo pulsado y el serotipo.

Los 80 *Sma*I-PFGE se compararon con el programa InfoQuest FP versión 4.5 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU). El dendograma obtenido se muestra en la Figura 32.

La población estudiada fue heterógena con rangos de similitud entre 42,6% y 100%. En general, los perfiles se agruparon en función de la combinación *emm*-T, salvo algunas excepciones. Considerando como cepas genéticamente relacionadas (clonales) las que presentaron perfiles con una similitud $\geq 80\%$ (Pinho, 2006) se pudieron definir 51 grupos diferentes.

El índice de discriminación de Simpson (que mide la probabilidad de que dos cepas genéticamente no relacionadas se incluyan en distinto perfil) fue de 0,94 para *Sma*I.

PFGE Sma-I

PFGE Sma-I

SmaI-PFGE	emm	T	n° cepas
P 10a	77	28	6
P 10b	77	28	17
P 32	28	NT	1
P 28	58	NT	1
P 58	58	NT	2
P 2a	78	11	15
P 2c	78	11	11
P 2b	78	11	3
P 77	5	5/27/44	1
P 67	89	B3264	1
P 70	89	B3264	1
P 71	75	25	1
P 39	60	28	1
P 60	89	B3264	4
P 5a	28	28	19
P 5c	28	28	3
P 5f	88	28	1
P 5d	28	28	10
P 5b	28	28	10
P 5e	28	28	2
P 74	22	12	1
P 23	2	2	8
P 40	2	2	2
P 24	2	2	9
P 9	6	6	1
P 3	4	4	15
P 37	28	28	2
P 11	4	4	6
P 51a	28	28	16
P 51c	28	28	3
P 51b	28	28	11
P 61	60	28	1
P 72	58	NT	2
P 80	48	28	1
P 47	73	13	4
P 55	87	28	9
P 56	22	12	4
P 8	73	13	6
P 76	87	28	38
P 12	22	12	5
P 34	22	12	2
P 31	77	13	7
P 59	33	3/13	1
P 50	9	9	1
P 54	36	NT	1
P 78	29	NT	1
P 46	58	NT	1
P 53	63	NT	1
P 57	60	28	3
P 27	71	NT	1
P 44	92	NT	1
P 48	75	25	2
P 16	18	NT	3
P 35	77	14/49	1
P 30	62	12	2
P 63	64/52	3/13	1
P 65	50	NT	1
P 14	28	28	1
P 66	87	28	1
P 15	3	3 /NT	70
P 19	44	5/27/44	20
P 62	3	3/13	2
P 73	87	28	1
P 43	64	NT	1
P 75	31/13	NT	1
P 42	50	NT	1
P 45	83	NT	1
P 6	2	2	22
P 36	11	11	1
P 69	73	13	1
P 17	11	11	17
P 7	78	11	1
P 64	11	11	6
P 22	6	6	16
P 4	6	6	6
P 21	6	6	2
P 26	6	6	15
P 18	28	28	1
P 33	22	12	1
P 13	9	9	25
P 49	9	9	1
P 29	94/13	B3264	2
P 38	NT	NT	1
P 68	18	18	1
P 1	12	12	49
P 52	12	12	2
P 20	1	1	122
P 41	1	1	3
P 79	79	11	3

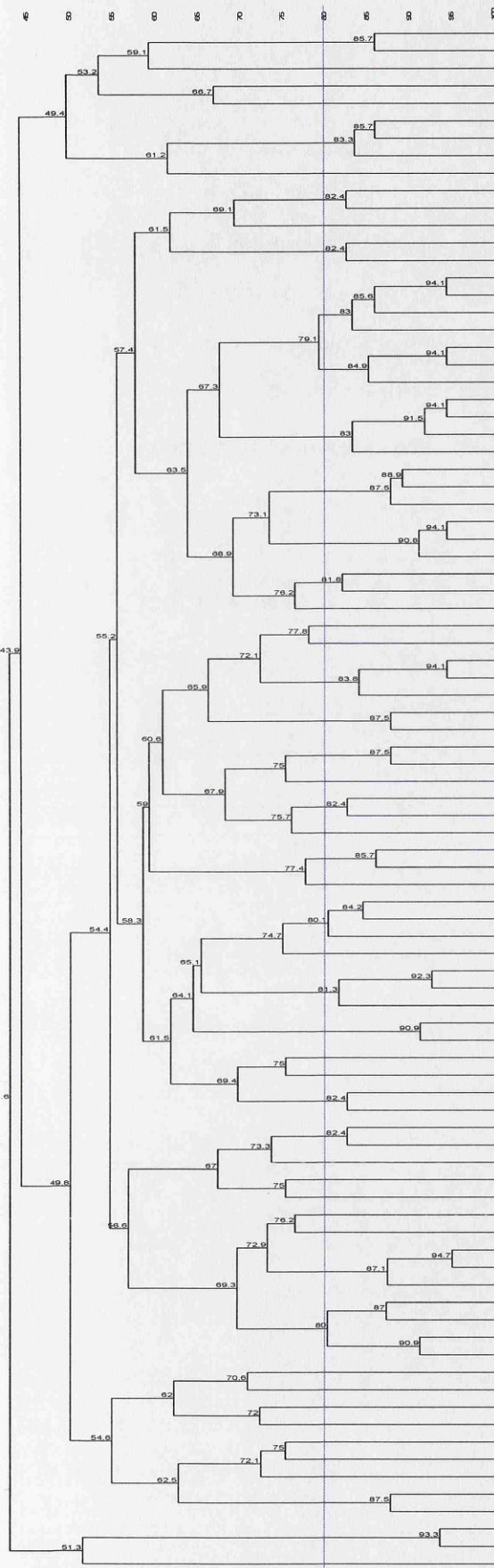


Figura 32. Dendrograma de los pulsotipos obtenidos con *SmaI* para 681 cepas de SGA.

4.1.1. Correlación *Sma*I-PFGE y fórmula antigénica

Como se ha comentado en el apartado anterior, se observó una asociación entre el patrón de campo pulsado obtenido y el serotipo (Tabla 28), de modo que no se encontró ningún perfil presente en varios serotipos distintos. La única excepción fue la observada en los serotipos *emm3*T3, *emm3*TNT y *emm3*T3/13 que compartieron los perfiles *Sma*15 y *Sma*62. Esto nos indica que pertenecen a un mismo clon y en un número importante de cepas *emm3* el antígeno T no se detecta o no se expresa.

Por otro lado, un mismo serotipo puede presentar varios perfiles de campo pulsado como se observa en la Tabla 30.

Los perfiles *Sma*20 *emm1*T1 y *Sma*41 *emm1*T1 presentaron un 93,3% de similitud entre sí, mientras que la similitud para *Sma*3 *emm4*T4 y *Sma*11 *emm4*T4 fue de un 87,5%.

En los serotipos *emm28*T28 (11 perfiles), *emm6*T6 (6 perfiles), *emm22*T12 (5 perfiles) y *emm87*T28 (5 perfiles) se observó mayor diversidad genética.

Tabla 30. Correlación entre *Sma*I-PFGE y la fórmula antigénica de 898 cepas de SGA.

1	1	20 41 ND	122 3 4	129
2	2	6 23 24 40	22 8 9 2	41
3	NT	62 15	1 40	72
3	3	15	26	
3	3/13	15 62	4 1	
4	4	3 11 ND	15 6 116	137
5	5/27/44	77	1	1
6	6	4 9 21 22 26 ND	6 1 2 16 15 27	67
9	9	13 49 50	25 1 1	27
11	11	17 36 64	17 1 6	24
12	12	1 25 52 ND	49 1 2 16	68
12	NT	ND	1	1
18	18	68	1	1
	NT	16	3	3
22	12	12 34 56 74 33	5 2 4 1 1	13
28	28	5a 5b 5c 5d 5e 14 18 37 51a 51b 51c ND	19 10 3 10 2 1 1 2 16 11 3 1	78

Continuación tabla 30.

28	NT	32 ND	1 1	2
29	NT	78	1	1
31/13	NT	75	1	1
33	13	59	1	1
36	NT	54	1	1
44	5/27/44	19	20	20
48	28	80	1	1
50	NT	42 65	1 1	2
58	NT	28 46 58 72	1 1 2 2	6
60	28	61 39 57	1 1 3	5
62	12	30	2	2
63	NT	53	1	1
64	NT	43	1	1
64/52	3/13	63	1	1
71	NT	27	1	1
73	13	8 47 69	6 4 1	11
75	25	48 71 ND	2 1 43	46
77	13	31	7	7
77	14/49	35	1	1
77	28	10a 10b	6 17	23
78	11	2a 2b 2c 7	15 3 11 1	30
79	11	79	3	3
81	B3264	ND	1	1
83	NT	45	1	1
84	25	ND	6	6
87	28	55 66 73 76 ND	9 1 1 38 1	50
88	28	5f	1	1
89	B3264	60 67 70	4 1 1	6
92	NT	44	1	1
94/13	B3264	29	2	2
NT	NT	38	1	1

 ND= no digerible con *Sma*l.

4.2. Análisis de las cepas no digeribles con *Sma*I

Como se ha comentado, el 24,2 % (n=217) de las cepas no fueron digeribles con *Sma*I (Tabla 31). Entre las cepas de SGA no digeribles (ND) destacaron *emm4*T4 (n=116) y *emm75*T25 (n=43). Los serotipos *emm6*T6 (n=27) y *emm12*T12 (n=16) también presentaron un número representativo de cepas no digeribles.

Analizando la representación de cepas no digeribles frente al total de cada uno de los serotipos concretos (Tabla 31), se observó un elevado porcentaje en los serotipos *emm4*T4 (84,7%) y *emm75*T25 (93,5%). Los datos obtenidos para *emm6*T6 y *emm12*T12 también fueron relevantes, con valores del 40,3% y 23,5% respectivamente. En el serotipo *emm84*T25 el 100% de las cepas no fueron digeribles con *Sma*I.

Tabla 31. Distribución por orden de frecuencia de las fórmulas antigénicas de 217 cepas de SGA no digeribles con *Sma*I.

4	4	116	84,7
75	25	43	93,5
6	6	27	40,3
12	12	16	23,5
84	25	6	100,0
1	1	4	3,1
12	NT	1	100,0
81	B3264	1	100,0
87	28	1	2,0
28	28	1	1,3
28	NT	1	50,0
Total		217	

% serotipos: porcentaje de representación de las cepas no digeribles con *Sma*I frente al número total de cepas presentes en cada uno de los serotipos.

4.3. Análisis mediante *Sfi*I-PFGE

En el caso de las cepas que no fueron digeribles con *Sma*I (n=217) se recurrió a la digestión con la enzima de restricción *Sfi*I. Los patrones de restricción obtenidos presentaron un número menor de fragmentos que los producidos por *Sma*I. En este caso obtuvimos 23 pulsotipos (Tabla 32) que presentaron entre 3 y 6 bandas, cuyos rangos de peso molecular oscilaron entre 48,5 y 582 kb. En la Figura 33 se muestra un gel obtenido con *Sfi*I.

Al igual que en el caso de *Sma*I, cada pulsotipo *Sfi*I se asoció con un serotipo, que a su vez podía presentar varios patrones de restricción diferentes. La distribución de los pulsotipos y serotipos se muestra en Tabla 32.

Tabla 32. Pulsotipos obtenidos tras digerir con *Sfi*I 217 cepas de SGA no digeribles con *Sma*I .

		1	79
		2	13
		3	7
		4	2
		5	2
4	4	6	1
		7	1
		8	1
		9	1
		10	1
		11	8
75	25	12	41
		13	2
12	12	14	8
		15	6
12	NT	15	1
12	12	16	2
6	6	17	27
1	1	18	3
		19	1
28	28	20	1
28	NT	20	1
87	28	21	1
84	25	22	6
81	B3264	23	1
217			

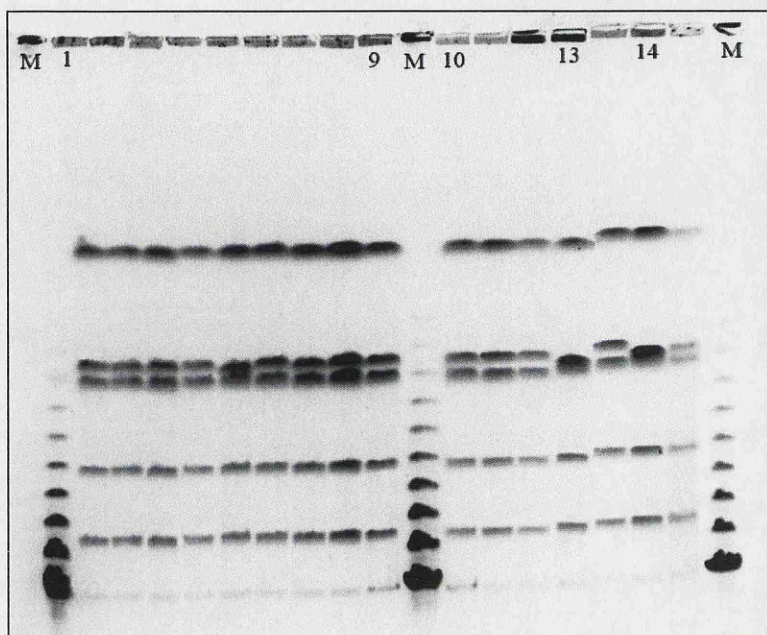


Figura 33. Electroforesis en campo pulsado de cepas de SGA *emm4T4* digeridas con la enzima de restricción *SfiI*. En todos los carriles se observa el pulsotipo *Sfi1*, excepto en los carriles 13 y 14 en los que se identifica el perfil *Sfi2*. M: concatémoro del fago lambda.

Los 23 perfiles se compararon con el programa InfoQuest FP versión 4.5 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). El dendograma obtenido se muestra en la Figura 34.

Se observó un rango de similitud de 12,2% al 100 %. Considerando como cepas genéticamente relacionadas (clonales) las que presentaron perfiles con una similitud $\geq 80\%$ (Pinho, 2006) se pudieron definir 20 grupos diferentes.

En uno de los grupos se encuadraron los patrones *Sfi1* (n=79) y *Sfi2* (n=13) (Figura 33) que únicamente se diferenciaron en una banda y pertenecen al serotipo *emm4T4*, esto indica que están claramente relacionados. Por otro lado, *Sfi 4* (n=2) y *Sfi 5* (n=2) también se pudieron agrupar ya que presentaron 80% de similitud, al igual que ocurrió con *Sfi18* (n=3) y *Sfi19* (n=1) del serotipo *emm1T1*.

El índice de discriminación de Simpson obtenido para *SfiI* fue de 0,81.

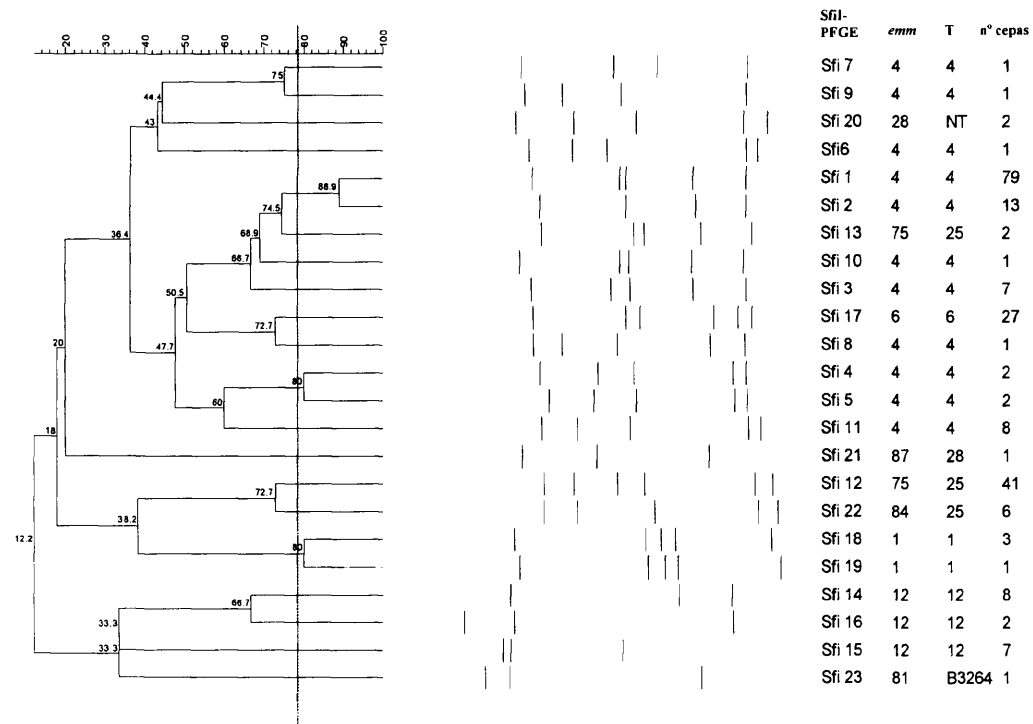


Figura 34. Dendrograma de los pulsotipos obtenidos con la enzima de restricción *Sfi*I en cepas no digeribles con *Sma*I (n=217).

5. ESTUDIO DE BROTES

Se estudiaron 18 brotes de SGA durante el periodo 1994-2006. Los brotes fueron causados por varios serotipos y el rango de cuadros clínicos fue amplio. Las características de los brotes se muestran en la Tabla 33.

Tabla 33. Brotes de SGA estudiados en el CNM durante un periodo de 13 años (1994-2006).

1	1996	Madrid	Intrahospitalario	Fascitis necrotizante	3	8	78	11
2	2001	Baza	Intrahospitalario	Shock séptico	2	2	1	1
3	2000	Madrid	Alimentario	Faringoamigdalitis	1	1	1	1
4	1995	La Coruña	Alimentario	Faringoamigdalitis	5	3	11	11
5	1997	Madrid	Familiar	Celulitis	2	1	22	12
6	2000	Pamplona	Familiar	Faringoamigdalitis	6	6	4	4
				Dermatitis perianal			6	6
				Escarlatina			28	28
							73	13
7	1996	Barcelona	Comunitario	Escarlatina	7	10	4	4
8	2001	Lleida	Comunitario	Escarlatina	4	4	3	NT
9	2004	Valencia	Comunitario	Escarlatina	7	7	1 2	1 2
10	2004	Valencia	Comunitario	Escarlatina	2	23	6	6
11	2004	Valencia	Comunitario	Escarlatina	—	7	87	28
12	2004	Las Palmas	Comunitario	Shock séptico	4	—	1	1
13	2005	Madrid	Comunitario	Escarlatina	—	4	9	9
14	2006	Baracaldo	Guardería	Shock séptico	9	12	4	4
15	2006	M. Ebro	Comunitario	Sepsis	4	—	3 4	3 4
16	2006	Lorca	Comunitario	Sepsis	3	—	4	4
17	2006	P. Mallorca	Comunitario	Varios*	47	—	varios*	varios*
18	2006	La Gomera	Comunitario	Escarlatina	37	—	87	28

Se indica el año en que tuvo lugar el brote, la localidad, el tipo de brote, el cuadro clínico desarrollado y el serotipo responsable. En algunos casos hubo varios serotipos responsables. Contactos: Personas que tuvieron contacto con los enfermos y fueron asintomáticos.

* Los serotipos mayoritariamente implicados fueron *emm4T4* y *emm12T12*. Los cuadros clínicos más destacados: faringoamigdalitis, escarlatina y celulitis.

Los brotes detectados fueron: 2 intrahospitalarios, 2 alimentarios, 2 familiares, 11 comunitarios y 1 en una guardería. Son destacables los dos brotes intrahospitalarios y 3 comunitarios que cursaron con cuadros invasivos graves como fueron fascitis necrotizante, shock séptico y sepsis. La escarlatina fue el cuadro clínico más frecuentemente observado entre los brotes (7 brotes comunitarios) ocasionados por *S. pyogenes*, presentando diversidad de serotipos.

Los dos brotes alimentarios registrados se produjeron en dos cuarteles militares, el cocinero fue el principal origen de la infección. En ambos casos se identificó la cepa tanto en enfermos como en contactos.

El brote familiar (brote 6) producido en el año 2000 se caracterizó por una alternancia de sucesivas infecciones durante un periodo de 10 meses (Figura 35). Se produjo el denominado efecto “ping-pong”, en el que diferentes serotipos de SGA adquiridos de la comunidad se transmiten entre miembros de una misma familia. En este caso, los cuatro serotipos descritos en la Tabla 33 se alternaron entre diferentes miembros de la familia ocasionando faringoamigdalitis, dermatitis perianal y escarlatina como se muestra en la Figura 35.

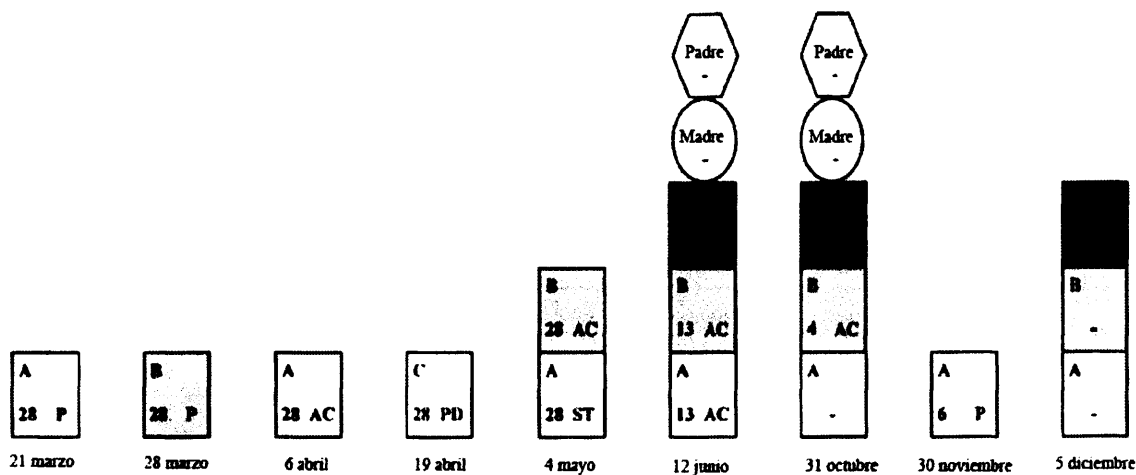


Figura 35. Cronología de aislados de SGA de miembros de una familia durante un periodo de 10 meses. A: hermana de 11 años; B: hermano de 10 años; C: hermano de 4 años; P: faringoamigdalitis; ST: dolor de garganta; PD: dermatitis perianal; SF: escarlatina; AC: portador asintomático. -: cultivo negativo. La numeración indica el antígeno T.

El brote 12 ocurrido en la isla de Gran Canaria entre los meses de febrero y abril de 2004 fue comunitario y cursó con 4 pacientes con diagnóstico de bacteriemia que fallecieron a consecuencia de un síndrome de shock tóxico estreptocócico.

6. GENES DE TOXINAS ERITROGÉNICAS

6.1. Análisis de genes toxigénicos

Con el fin de estudiar los genes de toxinas eritrogénicas de SGA, se analizaron 686 cepas que incluyeron todos los cuadros clínicos invasivos y una selección de cepas de celulitis, escarlatina y faringoamigdalitis. Se estudiaron mediante PCR múltiple 10 genes que codifican toxinas estreptocócicas: *speA*, *speB*, *speC*, *speF*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *ssa* y *smeZ*.

Los genes *speB* (93,3%), *speG* (83,4%) y *speF* (80,6%) fueron los más frecuentemente detectados entre las cepas de SGA. Por orden de prevalencia se indican los genes restantes: *speC* (57,1%), *smeZ* (35,6%), *ssa* (29,6%), *speJ* (27,6%) y *speA* (21,4%). *speH* (16,2%) y *speI* (12%) fueron los genes menos frecuentes. Estos datos se indican en la Tabla 34.

Tabla 34. Genes de toxinas detectados en 11 cuadros clínicos observados en 686 cepas de SGA

Fascitis	43	22	39	13	37	39	25	2	23	15	2
Shock	46	19	39	20	32	34	26	13	32	17	7
Escarlatina	92	21	82	42	68	70	14	13	30	54	11
Infecciones genitales	55	5	53	37	38	51	12	13	13	13	4
Sepsis	67	12	53	27	46	54	22	11	31	17	10
Otitis	41	13	39	18	37	37	8	6	19	9	5
Celulitis	140	12	136	108	101	112	39	17	26	18	15
Infecciones óseas	12	4	12	7	12	11	2	2	1	6	0
Infecciones respiratorias	24	12	24	9	24	23	8	4	16	3	2
Portadores	93	15	92	63	91	75	18	8	36	26	9
Faringoamigdalitis	73	12	71	48	67	66	15	22	17	25	17
Total	686	147	640	392	553	572	189	111	244	203	82
% frente al total		21,4	93,3	57,1	80,6	83,4	27,6	16,2	35,6	29,6	12,0

Tabla 35. Porcentaje de representación de los genes toxigénicos detectados en cada uno de los cuadros clínicos observados en 686 cepas de SGA.

Fascitis	43	51,2	90,7	30,2	86,0	90,7	58,1	4,7	53,5	34,9	4,7
Shock	46	41,3	84,8	43,5	69,6	73,9	56,5	28,3	69,6	37,0	15,2
Escarlatina	92	22,8	89,1	45,7	73,9	76,1	15,2	14,1	32,6	58,7	12,0
Infecciones genitales	55	9,1	96,4	67,3	69,1	92,7	21,8	23,6	23,6	23,6	7,3
Sepsis	67	17,9	79,1	40,3	68,7	80,6	32,8	16,4	46,3	25,4	14,9
Otitis	41	31,7	95,1	43,9	90,2	90,2	19,5	14,6	46,3	22,0	12,2
Celulitis	140	8,6	97,1	77,1	72,1	80,0	27,9	12,1	18,6	12,9	10,7
Infecciones óseas	12	33,3	100,0	58,3	100,0	91,7	16,7	16,7	8,3	50,0	0,0
Infecciones respiratorias	24	50,0	100,0	37,5	100,0	95,8	33,3	16,7	66,7	12,5	8,3
Portadores	93	16,1	98,9	67,7	97,8	80,6	19,4	8,6	38,7	28,0	9,7
Faringoamigdalitis	73	16,4	97,3	65,8	91,8	90,4	20,5	30,1	23,3	34,2	23,3

6.1.1. Correlación genes toxigénicos y cuadro clínico

La frecuencia de los genes estudiados en cada uno de los cuadros clínicos de forma individual se muestra en la Tabla 34 y Tabla 35.

No se observaron diferencias notables en la frecuencia de los genes detectados entre cada uno de los cuadros clínicos. No obstante, se pueden resaltar algunos aspectos relevantes.

Los genes *speB*, *speF* y *speG*, fueron muy abundantes en la mayoría de los cuadros clínicos (70,0-100,0%). El gen *speA* se detectó aproximadamente en la mitad de las cepas que produjeron fascitis necrotizante (51,2%), infecciones respiratorias (50,0%) y shock tóxico (41,3%), mientras que en el resto de cuadros clínicos su frecuencia fue menor (8,6-33,3%). *SmeZ* también destacó en estos tres cuadros clínicos con valores del 53,5%; 66,7% y 69,6%, respectivamente.

El gen *speC* destacó en el cuadro clínico de celulitis (77,1%). En el caso de *speI* su frecuencia fue mayor en cepas de fascitis necrotizante (58,1%) y shock tóxico (56,5%).

speH sólo se detectó en el 4,7% y 8,6 % de las cepas de fascitis necrotizante y portadores, en el resto de cuadros clínicos los valores fueron mayores del 12,0%. *speI* fue poco frecuente en todos los cuadros clínicos, en infecciones óseas no se detectó este gen. La representación del gen *ssa* fue notable en los cuadros clínicos de escarlatina (58,7%) e infecciones óseas (50,0%).

Como se ha comentado previamente *speB*, *speF* y *speG*, se observan en todos los cuadros clínicos con valores mayores del 70,0%. Por tanto, destacar que en fascitis necrotizante alrededor del 50,0% de las cepas presentaron los genes *speA*, *speI* y *smeZ*. En el caso de shock séptico prácticamente el 70,0% de las cepas presentaron *smeZ* mientras que *speI* se observó hasta en un 56,6% de los casos. En escarlatina destacó *ssa* (58,7%) y *speC* que se observó casi en el 50,0% de las cepas. En infecciones genitales *speC* se observó en el 67,3% de SGA, el resto de genes, excluyendo *speB*, *speF* y *speG*, fueron menos frecuentes con valores entre 23,6%-7,3%.

En sepsis y otitis después de *speB*, *speF* y *speG*, los genes más frecuentes fueron *speC* y *smeZ* con valores entre 40,0%-46,0%.

En celulitis destacó *speC* (77,1%). En infecciones óseas *speC* (58,3%) y *ssa* (50%) fueron los siguientes genes destacados después de *speB*, *speF* y *speG*.

En infecciones respiratorias *smeZ* y *speA*, se observaron en el 66,7% y 50,0% de los casos respectivamente. En portadores y faringoamigdalitis destacar *speC*.

6.1.2. Correlación genes toxigénicos y fórmula antigénica

Se analizó la frecuencia de los genes estudiados según el serotipo *emm*-T como se muestra en la Tabla 36 y 37, resaltando en gris algunos resultados destacables.

En general, la frecuencia de *speA* en SGA fue baja (21,4%), sin embargo, se detectó con elevada frecuencia en los serotipos *emm1T1* (77,2%), *emm3TNT* (76,7%), *emm 3T3* (50,0%) y *emm 3T3/13* (85,7%).

speB se detectó en todos los serotipos excepto en una cepa *emm 5T5/27/44*. En el caso de *speF*, no se consiguió amplificar el gen en tres serotipos: *emm71TNT*, *emm 83TNT* y *emm NTTNT*.

El gen *speC* destacó en varios serotipos: *emm2T2* (97,1%), *emm77T28* (95,2%), *emm75T25* (93,3%), *emm11T11* (90,0%), *emm6T6* (89,1%), *emm28T28* (88,0%), *emm4T4* (82,7%), *emm78T11* (80,0%) y *emm87T28* (75,0%). Mientras que en otros como *emm1T1* (7,0%), *emm3T3* (5,0%), *emm3TNT* (13,3%) y *emm3T3/13* (14,3%) su frecuencia fue menor.

speG mostró una amplia representación en todos los serotipos excepto en *emm4T4* (4,9%) y *emm77T28* (14,3%). *speJ* fue poco frecuente en SGA, en más de la mitad de los serotipos (26) estudiados no se detectó este gen. Sin embargo, se observó con elevada frecuencia en *emm1T1* (79,8%), *emm28T28* (74,7%) y *emm44T5/27/44* (69,2%). Al igual que *speJ*, el gen *speH* fue poco frecuente, destacando en los serotipos *emm12T12* (92,5%), *emm75T25* (73,3%) y *emm73T13* (72,7%).

smeZ destacó notablemente en tres serotipos: *emm4T4* (98,8%), *emm1T1* (96,5%) y *emm87T28* (90,0%). En el resto de serotipos su frecuencia fue baja. El gen *ssa* destacó en los serotipos: *emm3T(3-NT-3/13)* (95,0%-93,3%-85,7%), *emm44T5/27/44* (92,3%) y *emm4T4* (90,1%). *speI* fue poco frecuente (12,0%) en las cepas de SGA, no obstante, destacó en *emm12T12* (79,2%) y *emm75T25* (73,3%).

Tabla 36. Genes de toxinas detectados en los diferentes serotipos *emm*-T de 686 cepas de SGA.

1	1	114	88	104	8	92	112	91	5	110	7	2
2	2	35	0	35	34	27	35	0	0	1	0	2
3	NT	30	23	28	4	26	30	2	1	1	28	0
3	3	20	10	16	1	14	20	2	1	0	19	0
3	3/13	7	6	7	1	7	7	1	0	0	6	0
4	4	81	4	77	67	65	4	5	4	80	73	3
5	5/27/44	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
6	6	64	2	60	57	50	61	5	2	5	2	0
9	9	15	1	15	1	15	15	0	0	0	14	0
11	11	20	1	19	18	15	20	0	7	1	0	5
12	12	53	1	52	15	42	53	1	49	2	1	42
12	NT	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1
18	NT	3	2	2	3	2	2	0	0	0	0	0
18	18	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0
22	12	11	4	10	7	8	11	1	0	0	11	0
28	28	75	1	68	66	54	72	56	2	3	4	1
28	NT	2	0	2	2	2	2	0	1	1	1	0
29	NT	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
33	13	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0
36	NT	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0
44	5/27/44	13	0	12	2	11	13	9	1	0	12	0
48	28	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
50	NT	2	1	2	2	1	1	0	0	2	0	0
58	NT	5	0	5	1	4	5	0	5	0	4	0
60	28	3	0	3	1	3	0	0	0	0	0	0
62	12	2	0	2	2	2	2	0	0	2	1	0
64	NT	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0
71	NT	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
73	13	11	0	10	8	7	9	1	8	1	0	5
75	25	15	0	14	14	15	15	1	11	1	1	11
77	13	5	0	5	5	5	3	0	0	2	0	2
77	28	21	0	21	20	21	3	1	0	9	2	1
77	14/49	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
78	11	30	1	28	24	26	30	0	2	1	1	1
79	11	3	0	3	3	3	3	2	3	0	0	3
81	B3264	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0
83	NT	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
84	25	3	0	3	3	3	3	0	3	0	1	3
87	28	20	1	16	15	15	19	8	1	18	10	0
88	28	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0
89	B3264	6	0	5	2	4	6	0	0	0	1	0
64/52	3/13	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
94/13	B3264	2	0	2	0	2	2	0	2	0	0	0
NT	NT	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
Total		686	147	640	392	553	572	189	111	244	202	82

Tabla 37. Porcentaje de los genes de toxinas para las fórmulas antigénicas (*emm-T*) que presentaron más de 10 cepas

1	1	114	77,2	91,2	7,0	80,7	98,2	79,8	4,4	96,5	6,1	1,8
2	2	35	0,0	100,0	97,1	77,1	100,0	0,0	0,0	2,9	0,0	5,7
3	NT	30	76,7	93,3	13,3	86,7	100,0	6,7	3,3	3,3	93,3	0,0
3	3	20	50,0	80,0	5,0	70,0	100,0	10,0	5,0	0,0	95,0	0,0
4	4	81	4,9	95,1	82,7	80,2	4,9	6,2	4,9	98,8	90,1	3,7
6	6	64	3,1	93,8	89,1	78,1	95,3	7,8	3,1	7,8	3,1	0,0
9	9	15	6,7	100,0	6,7	100,0	100,0	0,0	0,0	0,0	93,3	0,0
11	11	20	5,0	95,0	90,0	75,0	100,0	0,0	35,0	5,0	0,0	25,0
12	12	53	1,9	98,1	28,3	79,2	100,0	1,9	92,5	3,8	1,9	79,2
22	12	11	36,4	90,9	63,6	72,7	100,0	9,1	0,0	0,0	100,0	0,0
28	28	75	1,3	90,7	88,0	72,0	96,0	74,7	2,7	4,0	5,3	1,3
44	5727/44	13	0,0	92,3	15,4	84,6	100,0	69,2	7,7	0,0	92,3	0,0
73	13	11	0,0	90,9	72,7	63,6	81,8	9,1	72,7	9,1	0,0	45,5
75	25	15	0,0	93,3	93,3	100,0	100,0	6,7	73,3	6,7	6,7	73,3
77	28	21	0,0	100,0	95,2	100,0	14,3	4,8	0,0	42,9	9,5	4,8
78	11	30	3,3	93,3	80,0	86,7	100,0	0,0	6,7	3,3	3,3	3,3
87	28	20	5,0	80,0	75,0	75,0	95,0	40,0	5,0	90,0	50,0	0,0
Total		628										

En función de los datos obtenidos, podemos destacar que en las cepas *emm1T1* la representación de los genes *speA*, *speJ* y *smeZ* fue elevada mientras que *speC* fue poco frecuente. En el caso de *emm3T(3-NT-3/13)* destacó la presencia de *speA* y *ssa*, así como la baja incidencia de *speC*.

En *emm4T4* destacaron notablemente *smeZ* y *ssa* frente a la baja frecuencia de *speG*, gen elevadamente frecuente en las cepas SGA. En cepas *emm77T28* también destacó la baja incidencia de *speG* y una elevada frecuencia de *speC*.

En *emm28T28* destacaron *speC* y *speJ* mientras que en *emm87T28* lo hicieron *smeZ* y *speC*. En las fórmulas antigénicas *emm12T12* y *emm75T25* es destacable la elevada presencia de genes *speH* y *speI*. Por último, resaltar que las cepas *emm44T5/27/44* se caracterizaron por un número alto de genes *speJ* y *ssa*.

6.2. Análisis de la fórmula toxigénica

Denominaremos fórmula toxigénica a las diferentes combinaciones observadas de los 10 genes estudiados. Se detectaron hasta 119 fórmulas toxigénicas, mostradas en la Tabla 38. Estos perfiles incluyeron entre 1-8 genes, siendo los perfiles de 4 y 5 genes los mayoritarios.

El número de cepas por fórmula toxigénica fue menor de 10 en el 85,7 % de los casos, sólo en 17 perfiles (14,3%) se observó un número de cepas igual o superior a 10. Las combinaciones más frecuentes fueron: BCFG (15,5%), ABFGJZ (7,3%), BCFZssa (5,5%), BCFGJ (5,0%), ABFGssa (4,7%), BFGssa (4,4%), BCFGHI (4,1%), BFGHI (3,7%) y BCG (3,4%).

Tabla 38. Fórmulas toxigénicas detectadas en 686 cepas de SGA aisladas entre 1994 y 2006.

Las más frecuentes se encuentran resaltadas en gris.

ABGJHZssaI	1	BCFZssaI	1	BFGJssa	9	BCF	15
BCFJHZssaI	1	BCGJZssa	1	BFGJZ	6	BCG	23
BCFGJHZssa	1	BFHZssaI	1	BFGZssa	1	BCH	1
ABCFGJZ	1	BFGHZI	1	CFGZssa	1	BCZ	1
ABFGJHssa	1	BFGJZssa	1	ABCG	1	BFG	15
ABFGJHZ	3	ABCFG	2	ABJZ	1	BFssa	1
ABFGJZI	1	ABCGH	1	ABGssa	1	BGH	3
ABFGJZssa	5	ABCGJ	1	AGJssa	1	BGJ	1
BCFGHssaI	1	ABCGssa	2	AGJZ	3	BGZ	1
BCFGHZssa	1	ABFGJ	1	BCFG	106	BHZ	1
BCFGJHI	3	ABFGssa	32	BCFssa	1	CFG	2
BCFGJHssa	1	ABFGZ	12	BCFZ	12	CGJ	3
BCFGJZssa	1	ABGJZ	8	BCGH	2	CGZ	1
BCFGZssaI	1	ACGJZ	1	BCGJ	12	CZssa	1
BCFJHZssa	1	AFGJZ	1	BCGssa	1	FGssa	1
BFGHZssaI	1	BCFGI	1	BFGH	8	FGZ	1
ABCFGJ	1	BCFGJ	34	BCGZ	1	GJH	1
ABCFGssa	2	BCFGssa	4	BCZssa	11	GJssa	1
ABCFGZ	2	BCFZssa	38	BFGJ	4	GJZ	2
ABCFZssa	5	BCFGH	6	BFGssa	30	Gzssa	2
ABFGJssa	2	BCFGI	4	BFGZ	9	BF	3
ABFGJZ	50	BCFGZ	7	BFZssa	10	BG	3
ABGJHZ	1	BCFZI	1	BGHI	5	CG	3
BCFGJH	1	BCGHI	2	BGJssa	1	CJ	1
BCFGJssa	2	BCGHssa	1	BGJZ	3	CZ	1
BCFGJZ	10	BCGJZ	2	CFGssa	2	Gssa	3
BCFGZssa	8	BCGZI	1	CGHI	1	GZ	1
BCFGZI	2	BEGHI	25	ABG	1	Zssa	3
BCFJZssa	2	BFGHssa	4	ACG	1	G	6
BCFGHI	28	BFGJH	1	AGssa	2	-	1

Abreviaturas: A (*speA*), B (*speB*), C (*speC*), F (*speF*), G (*speG*), H (*speH*), J (*speJ*), Z (*smeZ*), I (*speI*).-: ningún gen

6.2.1. Correlación fórmula toxigénica y cuadro clínico

Los diferentes perfiles de toxinas obtenidos para cada uno de los cuadros clínicos se muestran a continuación en las tablas 39-49.

Tabla 39. Perfiles de genes de toxinas detectados en **fascitis necrotizante**. Se observaron 20 perfiles diferentes (2-7 genes), las combinaciones con 5 genes fueron las más frecuentes (32,6%).

ABFGJZ	8	18,6	BCFJZssa	1	2,3
ABFGJZssa	5	11,6	ABFGssa	1	2,3
BCFG	5	11,6	BCFZssa	1	2,3
BFG	4	9,3	BCFGssa	1	2,3
BFGJZ	3	7,0	ABCGssa	1	2,3
ABGJZ	2	4,7	AFGJZ	1	2,3
BFGJssa	2	4,7	ACG	1	2,3
BFGHI	2	4,7	Gssa	1	2,3
ABCFGJZ	1	2,3	CJ	1	2,3
ABFGJssa	1	2,3		43	100
ABCFZssa	1	2,3			

Tabla 40. Perfiles de genes de toxinas detectados en **infecciones óseas**. Se observaron 8 perfiles (4-6 genes). Las combinaciones de 4 y 5 genes fueron las más frecuentes apareciendo ambas en el 41,7 % de las cepas estudiadas.

BCFG	3	25,0
ABCFZssa	2	16,7
ABFGssa	2	16,7
BCFGJ	1	8,3
BCFGH	1	8,3
BFGJssa	1	8,3
BFGH	1	8,3
BFGssa	1	8,3
	12	100

Tabla 41. Perfiles de genes de toxinas detectados en **shock tóxico**. Se observaron 29 perfiles diferentes (2-8 genes), las combinaciones con 5 genes fueron las más frecuentes (32,6%).

ABFGJZ	6	13,0	BCFGHI	1	2,2
BCFZssa	5	10,9	ABCFGssa	1	2,2
ABFGJHZ	3	6,5	ABGJHZ	1	2,2
ABGJZ	3	6,5	BCFGssa	1	2,2
BCFGJ	2	4,3	BCGHI	1	2,2
BFGHI	2	4,3	ACGJZ	1	2,2
BCFG	2	4,3	AGJZ	1	2,2
CFGssa	2	4,3	BGJZ	1	2,2
BCFJHZssaI	1	2,2	BFZssa	1	2,2
ABGJHZssaI	1	2,2	ABJZ	1	2,2
ABFGJHssa	1	2,2	Gzssa	1	2,2
BCFJHZssa	1	2,2	GJZ	1	2,2
BCFJZssa	1	2,2	Zssa	1	2,2
BCFGJZ	1	2,2	BG	1	2,2
BFHZssaI	1	2,2		46	100,0

Tabla 42. Perfiles de genes de toxinas detectados en **sepsis**. Se observaron 41 perfiles diferentes (1-7 genes).

ABFGJZ	5	7,5	BFGJZ	1	1,5
BCFZssa	4	6,0	BFGJssa	1	1,5
G	4	6,0	BCGZI	1	1,5
BCFGHI	3	4,5	BCGJ	1	1,5
ABGJZ	3	4,5	BGJZ	1	1,5
BCFG	3	4,5	BFZssa	1	1,5
BFGZ	3	4,5	BFGH	1	1,5
BFGssa	3	4,5	BFGJ	1	1,5
BCF	3	4,5	BCH	1	1,5
BCFGJHI	2	3,0	BHZ	1	1,5
BCFGI	2	3,0	CFG	1	1,5
AGJZ	2	3,0	Czssa	1	1,5
BFG	2	3,0	FGZ	1	1,5
BCFGZssaI	1	1,5	Gzssa	1	1,5
ABFGJZI	1	1,5	GJZ	1	1,5
BCFGZssa	1	1,5	GJssa	1	1,5
BFGJZssa	1	1,5	Gssa	1	1,5
ABFGssa	1	1,5	Zssa	1	1,5
BCFGJ	1	1,5	BG	1	1,5
BCFGZ	1	1,5	BF	1	1,5
BCFGH	1	1,5		67	100,0

Tabla 43. Perfiles de genes de toxinas detectados en **infecciones genitales**. Se observaron 30 perfiles diferentes (3-7 genes). La combinación con 4 genes (41,8%) fue la más frecuente seguida de las de 5 genes (30,9%).

BCFG	8	14,5	ABCGH	1	1,8
BCFGJ	4	7,3	BCFGI	1	1,8
BCG	4	7,3	BCFGH	1	1,8
ABFGssa	3	5,5	BCFGZ	1	1,8
BCFZ	3	5,5	BFGJH	1	1,8
BGH	3	5,5	CFGZssa	1	1,8
BCFGHI	2	3,6	ABGssa	1	1,8
BCGJZ	2	3,6	BCFssa	1	1,8
BFGJssa	2	3,6	BCGH	1	1,8
BFGH	2	3,6	BCGJ	1	1,8
BFGssa	2	3,6	BCGZ	1	1,8
BGJZ	2	3,6	BFGJ	1	1,8
BCFGHssaI	1	1,8	BFG	1	1,8
BCFGHZssa	1	1,8	BGZ	1	1,8
BCFGZssa	1	1,8	CGZ	1	1,8
			55	100	

Tabla 44. Perfiles de genes de toxinas detectados en **otitis**. Se observaron 19 perfiles diferentes (2-7 genes). Las combinaciones de 4 y 5 genes fueron las más frecuentes (31,7% cada una de ellas).

BCFG	8	19,5	BCFZI	1	2,4
ABFGJZ	6	14,6	BCFZssa	1	2,4
ABFGZ	5	12,2	BCFGH	1	2,4
BFGHI	3	7,3	BFGH	1	2,4
BCFGZssa	2	4,9	BCG	1	2,4
ABFGssa	2	4,9	BCZ	1	2,4
BFGssa	2	4,9	CGJ	1	2,4
BFGZ	2	4,9	BF	1	2,4
BCFGJZssa	1	2,4	Gssa	1	2,4
BCFGHI	1	2,4	41	100	

Tabla 45. Perfiles de genes de toxinas detectados en **escarlatina**. Se observaron 34 perfiles (2-6 genes), en este caso en una de las cepas no se consiguió amplificar ninguno de los 10 genes estudiados. Las combinaciones de 5 y 4 genes fueron las más frecuentes, observándose en el 37 % y 33,7% de las cepas, respectivamente.

ABFGssa	10	10,9	ABFGZ	1	1,1
BCFZssa	10	10,9	BCFGJ	1	1,1
BFGssa	10	10,9	BFGJZ	1	1,1
BCFG	8	8,7	BFGZssa	1	1,1
BCZssa	8	8,7	AGJssa	1	1,1
BCFGHI	5	5,4	BCGssa	1	1,1
BFGHI	5	5,4	BFGZ	1	1,1
ABFGJZ	4	4,3	BGJssa	1	1,1
BFGJssa	3	3,3	CGHI	1	1,1
BFGHssa	2	2,2	ABG	1	1,1
AGssa	2	2,2	BFG	1	1,1
BCG	2	2,2	FGssa	1	1,1
CG	2	2,2	BF	1	1,1
ABCFGssa	1	1,1	BG	1	1,1
ABFGJssa	1	1,1	CZ	1	1,1
BCFGJZ	1	1,1	Zssa	1	1,1
BCGJZssa	1	1,1	no detectado	1	1,1
			92	100	

Tabla 46. Perfiles de genes de toxinas detectados en **infecciones respiratorias** y una cepa de conjuntivitis. Se observaron 14 perfiles (4-6 genes). Las combinaciones de 5 genes fueron las mayoritarias (45,8%).

ABFGZ	5	20,8	BCFGZ	1	4,2
ABFGJZ	4	16,7	BFGHssa	1	4,2
ABCFGZ	2	8,3	BFGJZ	1	4,2
BCFGJZ	2	8,3	ABCG	1	4,2
BFGHI	2	8,3	BCFG	1	4,2
BCFGJssa	1	4,2	BFGssa	1	4,2
BCFGH	1	4,2	BFGZ	1	4,2
			24	100	

Tabla 47. Perfiles de genes de toxinas detectados en **celulitis**. Se observaron 34 perfiles (3-7 genes). La combinación con 4 genes fue la más frecuente (42,9%) , en este caso la combinación de 3 genes tuvo una amplia representación (25%) con respecto al resto de los cuadros clínicos.

BCFG	26	18,6	BFG	2	1,4
BCFGJ	16	11,4	CGJ	2	1,4
BCG	15	10,7	BFGHZssaI	1	0,7
BCF	12	8,6	BCFGJH	1	0,7
BCFZ	8	5,7	BCFGJssa	1	0,7
BCGJ	8	5,7	BCFZssaI	1	0,7
ABFGJZ	6	4,3	ABCGJ	1	0,7
BFGssa	5	3,6	ABCGssa	1	0,7
BGHI	5	3,6	ABFGJ	1	0,7
BCFGHI	3	2,1	ABFGZ	1	0,7
BCFZssa	3	2,1	BFGH	1	0,7
BFGHI	3	2,1	BFGJ	1	0,7
BCZssa	3	2,1	BFGZ	1	0,7
ABFGssa	2	1,4	BFssa	1	0,7
BCFGI	2	1,4	BGJ	1	0,7
BCFGZ	2	1,4	CFG	1	0,7
BCGH	2	1,4	GJH	1	0,7
			140	100	

Tabla 48. Perfiles de genes de toxinas detectados en **portadores y contactos**. Se observaron 16 perfiles (2-6 genes). La combinación de 4 genes fue la más frecuente (48,4%).

BCFG	35	37,6	BFGHI	3	3,2
BCFZssa	10	10,8	BCFGZI	2	2,2
ABFGJZ	8	8,6	BFG	2	2,2
BFZssa	8	8,6	BCFGH	1	1,1
ABFGssa	7	7,5	BCFGZ	1	1,1
BCFGJZ	6	6,5	BCGJ	1	1,1
BCFGHI	4	4,3	BFGssa	1	1,1
BCFGJ	3	3,2	GZ	1	1,1
			93	100	

Tabla 49. Perfiles de genes de toxinas detectados en **faringoamigdalitis**. Se observaron 29 perfiles (1-8 genes). La combinación de 5 genes fue la más frecuente (37%).

BCFGHI	9	12,3	BCFGJHssa	1	1,4
BCFG	8	11,0	ABCFGJ	1	1,4
BCFGJ	6	8,2	BFGHZI	1	1,4
BFGHI	5	6,8	BCFGZ	1	1,4
BFGssa	5	6,8	BCGHI	1	1,4
BCFGZssa	4	5,5	BCGHssa	1	1,4
ABFGssa	4	5,5	BFGHssa	1	1,4
BCFZssa	4	5,5	BCFZ	1	1,4
ABFGJZ	3	4,1	BCGJ	1	1,4
BFG	3	4,1	BFGH	1	1,4
ABCFZssa	2	2,7	BFGJ	1	1,4
ABCFG	2	2,7	BCG	1	1,4
BCFGssa	2	2,7	CG	1	1,4
BCFGJHZssa	1	1,4	G	1	1,4
BCFGJHI	1	1,4		73	100

No se observó el predominio de una fórmula toxigénica en un cuadro clínico concreto, los diferentes perfiles se observaron en múltiples cuadros clínicos. De modo que no se observó asociación entre el cuadro clínico y la fórmula antigénica.

6.2.2. Correlación fórmula toxigénica y antigénica

En la Tabla 50 se observan las 17 fórmulas toxigénicas más frecuentes, que como se ha comentado anteriormente constituyen los perfiles de toxinas que presentaron 10 o más cepas de SGA.

La fórmula toxigénica BCFG fue la mayoritaria, destacando en 5 serotipos concretos: *emm6T6* (35,8%), *emm2T2* (21,7%), *emm78T11* (15,1%), *emm28T28* (10,4%) y *emm11T11* (8,5%). En varias de las fórmulas toxigénicas restantes se observó una clara asociación con fórmulas antigénicas (serotipos) concretas.

ABFGJZ, segundo perfil más frecuente, y ABFGZ, fueron detectados en el serotipo *emm1T1*, exceptuando una cepa *emm87T28* en el primer caso y dos cepas en el segundo caso. Las fórmulas toxigénicas BCFZssa, BCZssa y BFZssa sólo fueron detectadas en cepas *emm4T4*, exceptuando una cepa *emm28T28* que también presentó el primer perfil. BCFGJ y BCGJ se asociaron con *emm28T28*. ABFGssa se detectó prácticamente en los serotipos *emm3T(3-NT-3/13)*. Por otro lado, BFGHI fue detectado únicamente en *emm12T12* y *emm12NT*, en el caso de BCFGHI se observó con mayor frecuencia en los serotipos *emm75T25* y *emm12T12*. BFGssa destacó en *emm9T9* mientras que BCF lo hizo en *emm77T28*.

En la Tabla 51 se muestran las fórmulas toxigénicas que presentaron menos de 10 cepas, debido al bajo número de cepas observadas no podemos deducir ninguna asociación entre serotipo y perfil toxigénico. No obstante, parecen destacar BFGZ y ABGJZ en *emm1T1* y BFGJssa en *emm44T5/27/44*.

Tabla 51. Fórmulas toxigénicas menos frecuentes (1-9 cepas) en las cepas de SGA con sus correspondientes serotipos. Entre paréntesis se indica el número de cepas. Gen *emm*: M.

BFGJssa	M44T5/27/44 (7)	9	BGIJZ	M1T1 (2)	3	BCFGZssa	M75T25	1
	M64NT (1)			M2T2 (1)		BCFJHZssa	M4T4	1
	M77T28 (1)		BGH	M12T12 (1)	3	BFGHZssa	M12T12	1
BFGZ	M1T1 (8)	9		M73T13 (2)		ABCFGJ	M6T6	1
	M2T2 (1)		CGJ	M28T28	3	ABGJHZ	M1T1	1
	M3NT (1)		BF	M1T1 (1)	3	BCFGJH	M75T25	1
BCFGZssa	M4T4 (2)	8		M60T28 (2)		BCFZssa	M4T4	1
	M62T12 (1)		BG	M3T3	3	BCGJZssa	M87T28	1
	M87T28 (4)			M28T28		BFGZssa	M4T4	1
ABGJZ	M1T1	8		M71NT		BFGHZI	M12T12	1
	M12T12 (3)		CG	M3NT (1)	3	BFGJZssa	M33T13	1
	M58NT (1)			M6T6 (2)		ABCGH	M12T12	1
BFGH	M78T11 (1)	8		M3NT		ABCGJ	M3NT	1
	M94/13B3264 (2)		Gssa	M3T3	3	ABFGJ	M28T28	1
	M81B3264 (1)			M44T5/27/44		ACGJZ	M1T2	1
	M6T6		Zssa	M4T4 (2)	3	AFGJZ	M1T3	1
	M36NT			M87T28 (1)		BCFQI	M78T11	1
BCFGZ	M62T12	7	ABCFGssa	M9T9	2	BCFZI	M77T28	1
	M73T13		ABCFGZ	M22T12		BCGHssa	M3NT	1
	M77T28			M1T1	2	BCGZI	M12T12	1
	M78T11		ABFGJssa	M3NT	2	BFGJH	M73T13	1
	M87T28			M3T3/13		BFGZssa	M87T28	1
	M6T6 (2)		BCFGJssa	M22T12	2	CFGZssa	M87T28	1
BCFGH	M11T11 (1)	6		M28T28		ABCG	M18NT	1
	M12T12 (1)		BCFGZI	M77T13	2	ABIZ	M1T1	1
	M28T28 (1)		BCFJZssa	M4T4	2	ABGssa	M3T3/13	1
	M78T11 (1)		ABCFG	M4T4	2	AGJssa	M1T1	1
BFGJZ	M1T1 (5)	6		M3T3/13		BCFssa	M77T28	1
	M6T6 (1)		BCGHI	M11T11	2	BCGssa	M22T12	1
	M6T6 (1)			M73T13		BCGZ	M50NT	1
	M28T28 (1)		ABCGssa	M22T12	2	BGJssa	M44T5/27/44	1
G	M78T11 (2)	6	CFGssa	M22T12	2	CGHI	M73T13	1
	M89B3264 (1)			M78T11		ABG	M6T6	1
	M11T11 (1)		BCGH	M11T11	2	ACG	M18NT	1
ABFGJZssa	M1T1	5		M12T12		BCH	NTNT	1
	M3T3 (1)		BCGJZ	M6T6	2	BCZ	M6T6	1
ABCFZssa	M4T4 (3)	5	AGssa	M3T3	2	BFssa	M28T28	1
	M50NT (1)		CFG	M5T5/27/44	2	BGJ	M28T28	1
BGHI	M12T12	5		M28T28		BGZ	M83NT	1
	M6T6 (2)		GJZ	M1T1	2	BHZ	M4T4	1
BCFGssa	M18T18 (1)	4	GZssa	M28T28	2	GGZ	M87T28	1
	M22T12 (1)			M87T28		CZssa	M4T4	1
	M2T2 (2)		ABGJHZssa	M1T1	1	FGssa	M75T25	1
BCFGI	M12T12 (1)	4	BCFJHZssa	M4T4	1	FGZ	M1T1	1
	M75T25 (1)		BCFGJHZssa	M87T28	1	GJH	M12T12	1
BFGHssa	M58NT	4	ABCFGJZ	M1T1	1	GJssa	M3T3	1
	M1T1 (1)		ABFGJHssa	M3T3	1	CJ	M28T28	1
BFGJ	M28T28 (3)	4	ABFGJZI	M1T1	1	CZ	M4T4	1
	M28T28 (1)		BCFGHssa	M84T25	1	GZ	M1T1	1
BCFGJHI	M79T11 (2)	3	BCFGHZssa	M28NT	1	-	M6T6	1
	M1T1	3	BCFGHJssa	M44T5/27/44	1		Total	223
ABFGJHZ	M1T1	3						
AGJZ	M1T1	3	BCFGJZssa	M4T4	1			

7. SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

La sensibilidad *in vitro* de SGA a los 6 antimicrobianos estudiados se muestra en la Tabla 52.

Tabla 52. Actividad *in vitro* de 6 antimicrobianos frente a 898 cepas de SGA mediante E-test.

S: sensible; R: resistente.

Penicilina	$\leq 0,003-0,015$	$\leq 0,003$	0,015	898	0	0
Vancomicina	0,12- ≤ 2	0,5	1	898	0	0
Eritromicina	0.06- >256	0,25	128	603	295	32,8
Clindamicina	0.06- >256	0,25	0,5	839	59	6,5
Tetraciclina	0.06-64	0,25	1	837	61	6,8
Rifampicina	0.007- ≥ 32	0,06	0,25	895	3	0,3

Las 898 cepas de SGA fueron sensibles a penicilina y vancomicina, detectando tres cepas resistentes a rifampicina. La resistencia a eritromicina alcanzó el 32,8% mientras que la resistencia a clindamicina y tetraciclina fue del 6,5% y 6,8%, respectivamente.

7.1. Análisis de la resistencia a macrólidos y clindamicina

Como se ha comentado anteriormente, el 32,8% (295) de las cepas de SGA fueron resistentes a eritromicina. El 6,5% (59) de todas las cepas estudiadas fueron resistentes a clindamicina, en ningún caso se detectó esta resistencia de modo independiente, sino asociada con resistencia a eritromicina.

Tabla 53. Cepas de SGA detectadas para cada una de las concentraciones de antibiótico especificadas (eritromicina y clindamicina) analizadas mediante E-test, así como el porcentaje (%) de representación frente al total.

	n° cepas	51	130	274	148	4	1	3	9	63	56	60	42	57	898
Eritromicina	%	5,7	14,5	30,5	16,5	0,4	0,1	0,3	1,0	7,0	6,2	6,7	4,7	6,3	100,0
	n° cepas	170	232	273	163	5	1	3	0	1	0	0	0	50	898
Clindamicina	%	18,9	25,8	30,4	18,2	0,6	0,1	0,3	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	5,6	100,0

Los rangos de concentración de los E-test de eritromicina y clindamina, así como las cepas detectadas para cada una de ellas se muestra en la Tabla 53. La CMI₅₀ y CMI₉₀ para ambos antibióticos se mostró previamente en la Tabla 52.

7.1.1. Correlación fórmula antigénica, cuadro clínico y resistencia a macrólidos

Las 295 cepas resistentes a eritromicina mostraron 21 fórmulas antigénicas, entre ellas destacaron: *emm4T4*, *emm75T25*, *emm28T28* y *emm6T6*. Las fórmulas antigénicas y los cuadros clínicos observados se muestran en la Tabla 54.

Considerando el total de las 898 cepas de SGA se analizó la representación de las cepas resistentes a eritromicina frente al total de un mismo tipo *emm*-T (Tabla 54). Interesantemente, en algunos serotipos como *emm75T25*, *emm84T25* y *emm4T4* la representación de las cepas resistentes a eritromicina fue muy elevada, alcanzando valores de hasta un 93,5 % en el serotipo *emm75T25* o incluso 100% en el serotipo *emm84T25*.

7.1.2. Fenotipos de resistencia a macrólidos

Se procedió a determinar el fenotipo de resistencia a eritromicina de las 295 cepas de SGA resistentes a eritromicina, según el método de doble difusión en disco. Se diferenciaron tres fenotipos: **MLS_b c** (resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B constitutiva), **MLS_b i** (resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B inducible) y el **fenotipo M**.

Se observó que el fenotipo M, responsable de la resistencia a eritromicina por un mecanismo de bomba de expulsión activa, fue claramente predominante presentándolo el 76,9% de las cepas, seguido del fenotipo MLS_b c (20,3%) y MLS_b i (2,7%). El número de cepas presente en cada fenotipo y los genes detectados de resistencia a macrólidos se muestran en la Tabla 55.

Tabla 55. Fenotipos y genes de resistencia a macrólidos observados en 295 cepas de SGA aisladas entre 1994-2006.

Fenotipo	Nº cepas (%)	ermA	ermB	ermC	ermF	ermT	Antibiótico	Concentración (µg/ml)	CMI ₅₀ (µg/ml)	CMI ₉₀ (µg/ml)
M	227 (76,9)	50	87	224	221	1	Eritromicina	1-≥256	32	128
							Clindamicina	0,06-0,5	0,25	0,5
MLS _b c	60 (20,3)	57	11	36	17	2	Eritromicina	8-≥256	≥256	≥256
							Clindamicina	1-≥256	≥256	≥256
MLS _b i	8 (2,7)	3	8	4	3	0	Eritromicina	2-≥256	16	32
							Clindamicina	0,06-0,5	0,25	0,5
Total	295 (100)	110	106	264	241	3				

Como se muestra en la Tabla 55, se observó un alto nivel de resistencia a eritromicina y clindamicina entre las cepas con fenotipo MLS_b c (CMI₅₀ y CMI₉₀ : ≥256 µg/ml). Las cepas con fenotipo MLS_b i mostraron CMIs sensibles a clindamicina y CMIs a eritromicina (CMI₅₀: 16 µg/ml y CMI₉₀ : 32 µg/ml) más bajas que en el caso anterior. Entre las cepas con fenotipo M se observaron los mismos valores de CMIs sensibles a clindamicina que para MLS_b i, mientras que las CMIs a eritromicina (CMI₅₀: 32 µg/ml y CMI₉₀ : 128 µg/ml) fueron algo más elevadas.

7.1.3. Genes de resistencia a macrólidos

La presencia de los genes de resistencia *erm*(B), *erm*(TR), *mef*(A/E) y *msr*(D) fue investigada mediante PCR para los 295 SGA resistentes a eritromicina. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 55.

Los genes *mef*(A/E) y *msr*(D) fueron los determinantes de resistencia a macrólidos más prevalentes, presentándolos 264 y 241 cepas, respectivamente. Los genes *erm*(B) y *erm*(TR) se detectaron en 110 y 106 cepas.

Se observaron combinaciones de genes muy diferentes en cepas con el mismo fenotipo. En la Tabla 56 se muestran las diferentes combinaciones de genes, con los correspondientes serotipos y fenotipos.

Nueve combinaciones diferentes de genes de resistencia a macrólidos fueron detectadas en las cepas con fenotipo MLS_Bc, todas las cepas presentaron el gen *erm*(B) excepto 3 de ellas, de las cuales una presentó *erm*(TR) en combinación con *mef*(A/E) y las 2 cepas restantes no produjeron ningún amplicón mediante PCR para ninguno de los cuatro genes estudiados.

Las cepas con fenotipo MLS_Bc' mostraron cinco combinaciones de genes y en todas se observó el gen *erm*(TR). En el caso del fenotipo M se observaron ocho combinaciones que presentaron el gen *mef*(A/E) excepto en tres cepas, dos de ellas llevaron *msr*(D), solo y en combinación con *erm*(TR). En la cepa restante no se consiguió amplificar ninguno de los cuatro genes estudiados.



msr(D)+ *mef*(A/E) fue la combinación de genes de resistencia a macrólidos más frecuente, observándose en el 38% de las cepas. *msr*(D)+ *mef*(A/E) +*erm*(TR) fue la segunda más prevalente al mostrarla el 19,7%. Todas estas cepas presentaron el fenotipo M. En tercer y cuarto lugar destacaron *erm*(B) + *msr*(D)+ *mef*(A/E) (11,2%) y *erm*(B) + *msr*(D)+ *mef*(A/E) +*erm*(TR) (9,2%), para los que se observaron diferentes fenotipos.

La asociación entre los diferentes *emm*-T y los genes de resistencia a macrólidos también se muestra en la Tabla 56.

Tabla 56. Combinaciones de genes de resistencia a macrólidos detectados en 295 SGA resistentes a eritromicina (ER) con sus correspondientes serotipos.

<i>emm</i>	T	n° cepas serotipo	ER	<i>erm</i> (B)	<i>erm</i> (TR)	<i>mef</i> (A/E)	<i>msr</i> (D)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	1	129	10	2	2	9	9					1			1					6	1	1
2	2	41	4	1	3	4	1					1				3						
3	3	26	1	0	0	0	1												1			
3	3/13	5	1	0	1	0	0										1					
4	4	137	116	18	39	116	115				1	14			3					62	36	
6	6	67	29	3	0	28	28	1*			2									26		
11	11	24	12	12	4	4	6	5*		1*	2*	2*	1*	1								
12	12	68	20	8	6	19	19		1		4				3					10	2	
12	NT	1	1	0	1	1	1														1	
22	12	13	3	0	3	0	2										1	2				
28	28	78	39	35	6	29	8	6*		3	18	4		4		2			1			1
28	NT	2	2	1	0	1	0				1										1	
44	5/27/44	20	1	0	1	1	1															1
71	NT	1	1	1	0	0	0	1														
75	25	46	43	19	32	42	42			1	1	4			14			1		6	17	
77	28	23	2*	1	2	2	0							1*		1*						
78	11	30	1	1	0	0	0	1														
81	B3264	1	1	1	1	1	1								1							
83	NT	1	1*	1	1	1	0							1*								
84	25	6	6	5	4	6	6					1			4					1		
88	28	1	1	1	0	0	1			1												
Total			295	110	106	264	241	14	1	5	21	33	2	7	27	6	2	3	1	112	58	3

FENOTIPO

	MLSb c		2 cepas MLSb c (1 cepa tetR) 1 cepa MLSb i
	MLSb i		3 cepas MLSb c (1 cepa tetR) 1 cepa MLSb i
	M		1 cepa MLSb i 1 cepa M

* tetR: cepas resistentes además a tetraciclina

n° cepas serotipo: indica el total de cepas de un serotipo entre las 898 cepas de SGA

1. *erm* (B)
2. *erm* (B) + *erm* (TR)
3. *erm* (B) + *msr* (D)
4. *erm* (B) + *mef* (A/E)
5. *erm* (B) + *msr* (D) + *mef* (A/E)
6. *erm* (B) + *msr* (D) + *erm* (TR)
7. *erm* (B) + *erm* (TR) + *mef* (A/E)
8. *erm* (B) + *msr* (D) + *mef* (A/E) + *erm* (TR)
9. *erm* (TR) + *mef* (A/E)
10. *erm* (TR)
11. *erm* (TR) + *msr* (D)
12. *msr* (D)
13. *msr* (D) + *mef* (A/E)
14. *msr* (D) + *mef* (A/E) + *erm* (TR)
15. ningún gen

El complejo de genes *mef*(A/E) y *msr*(D) fue mayoritario en casi todos los tipos *emm*-T, esta combinación fue detectada sola o en presencia de otros genes. Sin embargo, *erm*(B) fue el gen más frecuente en *emm*11T11, detectándose solo (n=5) o en presencia de otros genes (n=7). Destacar que 11 de estas 12 cepas *emm*11T11 también fueron resistentes a tetraciclina. *erm*(B) también fue el gen más frecuente en las cepas *emm*28T28, observándose junto a *mef*(A/E) en el 46,2% de las cepas.

La combinación *msr*(D)+ *mef*(A/E) predominó en los serotipos *emm*1T1 (6/10), *emm*4T4 (62/116), *emm*6T6 (26/29) y *emm*12T12 (10/20). En el caso de *emm*4T4 también destacó *msr*(D)+ *mef*(A/E) +*erm*(TR)(36/116). En *emm*75T25, *msr*(D)+ *mef*(A/E) +*erm*(TR)(17/43) y *erm*(B) + *msr*(D)+ *mef*(A/E) +*erm*(TR) (14/43) fueron las más destacadas.

7.1.4. Análisis SGA resistentes a eritromicina mediante PFGE

Todos los patrones de campo pulsado obtenidos fueron analizados en el apartado 4. En este caso se procedió a analizar de manera independiente los patrones de campo pulsado producidos por las 295 cepas resistentes a eritromicina. Sólo el 26,8 % (n= 79) de estas cepas resultaron ser digeribles con la enzima de restricción *Sma*I, se produjeron un total de 30 pulsotipos, con un rango de similitud de 38,78%-100%. Como se describió en el apartado 4 la tendencia general fue la agrupación en función del serotipo. En el dendograma (Figura 36) obtenido con *Sma*I no se observó una tendencia a la agrupación en función del fenotipo de resistencia.

Al comparar los perfiles de campo pulsado *Sma*I de las cepas resistentes a eritromicina frente al total de un mismo pulsotipo, se observó que el 94% de las cepas con pulsotipo *Sma*51a (*emm*28T28) y 73% con *Sma*51b (*emm*28T28), fueron cepas resistentes a eritromicina.

El 73,2% (n=216) de las cepas de SGA resistentes a eritromicina (n=295) no fueron digeribles con la enzima de restricción *Sma*I. Las 216 cepas fueron resistentes a eritromicina pero no a tetraciclina y presentaron el fenotipo M, excepto cuatro cepas, dos cepas fueron MLS_b i y las otras dos MLS_b c. Estas cepas no digeribles presentaron 10 combinaciones *emm*-T mostradas en la Tabla 57, siendo las más frecuentes *emm*4T4 y *emm*75T25.

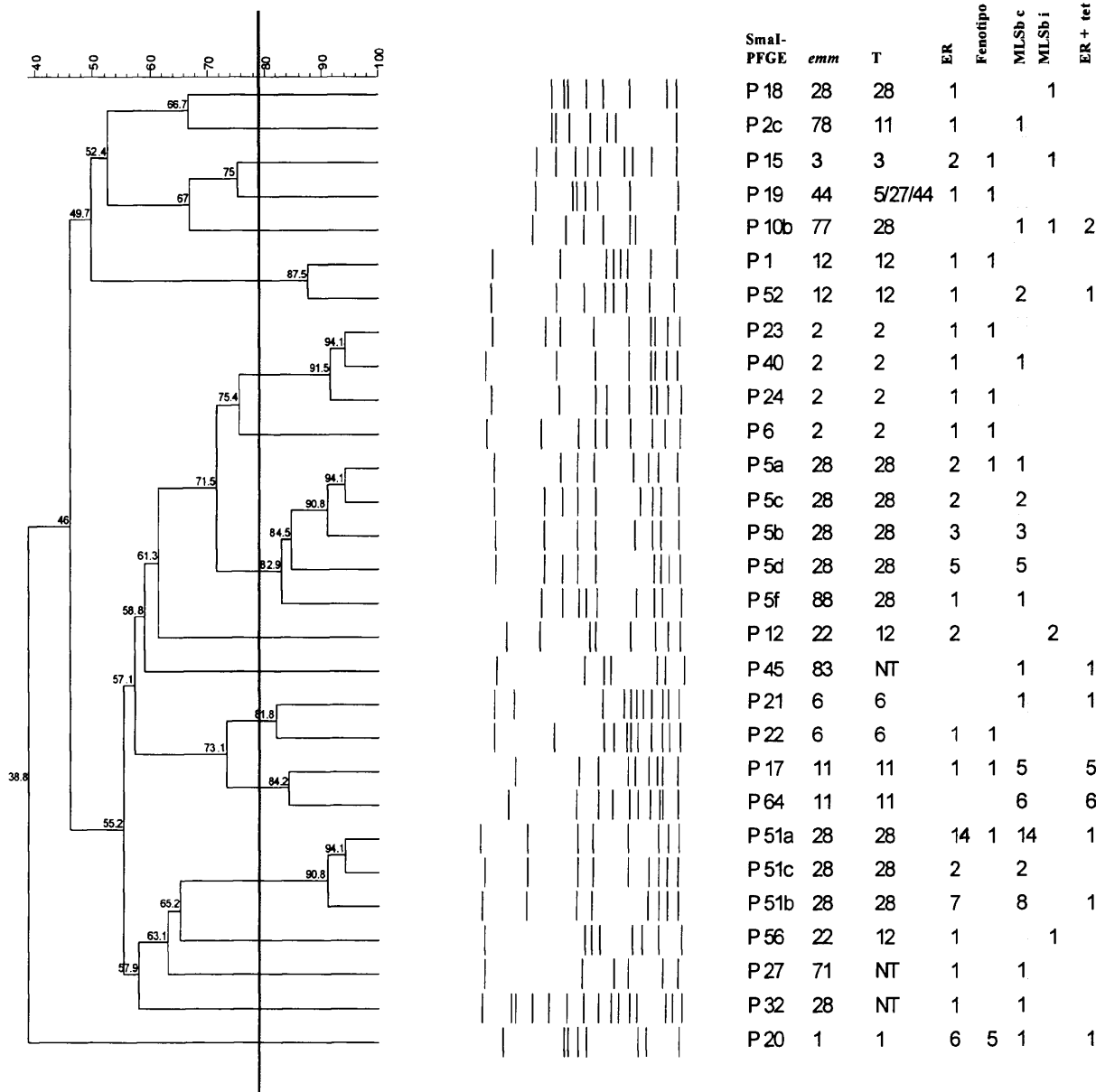


Figura 36. Dendrograma de los pulsotipos obtenidos con la enzima de restricción *SmaI* para las cepas de SGA resistentes a eritromicina. ER: Resistente a eritromicina; ER+tetR: Resistente eritromicina y además a tetraciclina.

Todas las cepas no digeribles, coinciden con las analizadas en el apartado 4.3, exceptuando una cepa *emm87T28* que fue sensible a eritromicina. Las 216 cepas fueron analizadas con la enzima de restricción *SfiI*, el dendograma y los datos obtenidos se indicaron en apartado 4.3.

Se observó que las cepas de SGA no digeribles (ND) con *SmaI* fueron aparentemente muy clonales, la mayoría de las cepas *emm4T4* ND (79,3%) presentaron dos patrones con más de una 80% de similitud, *Sfi1*(79) y *Sfi2*(13). En el caso de *emm75T25* y *emm6T6* ocurrió lo mismo, el 95,3% de las cepas ND presentaron el perfil *Sfi12* en el primer caso y el 100% el perfil *Sfi17* en el segundo caso.

Todas las cepas *emm75T25* que presentaron resistencia a eritromicina (n=43) resultaron ser no digeribles con *SmaI*, de las cuales 41 mostraron un patrón *Sfi12* y las 2 restantes *Sfi13*. Estas cepas resistentes constituyeron el 93,5 % del total de cepas de serotipo *emm75T25*.

En el caso del serotipo *emm84T25*, las 6 cepas que encontramos en nuestro estudio resultaron ser resistentes a eritromicina, no digeribles con *SmaI* y mostraron un patrón *Sfi22*.

Tabla 57. SGA resistentes a eritromicina no digeribles con la enzima de restricción *SmaI* con sus correspondientes serotipos, fenotipos y genes de resistencia a macrólidos. NT: no tipable.

1	1	1	2	4	4	M	4
12	12	4	2	16	16	M	16
12	NT	0	1	1	1	M	1
28	28	1	1	0	1	MLSbi	1
4	4	18	39	115	116	M	116
6	6	1	0	27	27	M	27
75	25	18	32	42	41	M	42
75	25	1	0	0	1	MLSbc	1
81	B3264	1	1	1	1	MLSbi	1
84	25	1	4	6	6	M	6
28	NT	1	0	0	1	MLSbc	1
total		47	82	212	215		216

7.2. Resistencia a tetraciclina

El 6,8% (61) de las cepas de SGA fueron resistentes a tetraciclina (Tabla 52). Los rangos de concentración analizados, así como las cepas detectadas para cada una de las concentraciones se indican en la Tabla 58. Como se observa la mayoría de las cepas de SGA presentaron CMI_s sensibles de 0,12 µg/ml y 0,25 µg/ml, la CMI₅₀ y CMI₉₀ se indicaron previamente en la Tabla 52.

Tabla 58. Cepas de SGA detectadas para cada una de las concentraciones de tetraciclina analizadas mediante E-test, así como el porcentaje (%) de representación frente al total.

Tetraciclina	n° cepas	50	294	296	157	34	6	0	4	27	25	5	898
	%	5,6	32,7	33,0	17,5	3,8	0,7	0,0	0,4	3,0	2,8	0,6	100,0

7.2.1. Correlación fórmula antigénica, cuadro clínico y resistencia a tetraciclina

Se observaron 20 fórmulas antigénicas (*emm*-T) entre las cepas resistentes a tetraciclina (61). *emm77T28* (37,7%) fue la principal combinación de serotipo observada entre las cepas resistentes a tetraciclina, el resto de serotipos mostraron bajos porcentajes de representación.

Considerando el total de las 898 cepas de SGA se analizó la representación de las cepas resistentes a tetraciclina frente al total de un mismo tipo *emm*-T, como se muestra en la Tabla 59. En los serotipos *emm77T28* y *emm60T28* la representación de cepas resistentes a tetraciclina fue muy elevada, 100% y 80% respectivamente. *emm11T11* también mostró una resistencia importante con valores del 50%.

7.2.2. Genes de resistencia a tetraciclina

La presencia de los genes de resistencia a tetraciclina *tet(M)* y *tet(O)* fue investigada mediante PCR en las 61 cepas resistentes a tetraciclina. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 60.

Tabla 60. Genes de resistencia a tetraciclina detectados en 61 cepas de SGA aisladas entre 1994-2006.

<i>emm</i>	T	<i>tet(M)</i>	<i>tet(O)</i>	<i>tet(M+O)</i>	n° cepas
1	1	0	0	1	1
6	6	1	0	1	2
11	11	9	0	3	12
12	12	1	0	0	1
22	12	0	0	2	2
28	28	2	0	0	2
31/13	NT	0	0	1	1
33	3/13	1	0	0	1
36	NT	1	0	0	1
50	NT	0	0	1	1
58	NT	1	0	0	1
60	28	3	0	1	4
73	13	0	0	2	2
77	13	1	0	0	1
77	14/49	1	0	0	1
77	28	1	10	12	23
78	11	1	0	0	1
81	B3264	0	0	0	0
83	NT	1	0	0	1
87	28	0	0	2	2
NT	NT	0	1	0	1
TOTAL		24	11	26	61

 8 cepas ER

 ER

 2 cepas ER

ER: resistentes a eritromicina

La combinación *tet(M)+tet(O)* fue predominante (42,6%) frente a *tet(M)* (39,3%) y *tet(O)* (18,0%) como únicos determinantes de resistencia.

7.2.3. PFGE de cepas resistentes a tetraciclina

Se analizaron los patrones de campo pulsado producidos por las 61 cepas resistentes a tetraciclina. Todas las cepas fueron digeribles con la enzima de restricción *Sma*I, produciendo 30 patrones de restricción, con un rango de similitud de 42,16 %-100%. En la Figura 37 se muestra el dendograma obtenido para estas cepas.

Al analizar los diferentes perfiles de las cepas resistentes a tetraciclina frente al total, observamos que todas las cepas que presentaron los perfiles *Sma*10a (*emm*77T28) y *Sma*64 (*emm*11T11) fueron resistentes a tetraciclina. El 94,1% de las cepas que presentaron *Sma*10b (*emm*77T28) fueron resistentes a tetraciclina.

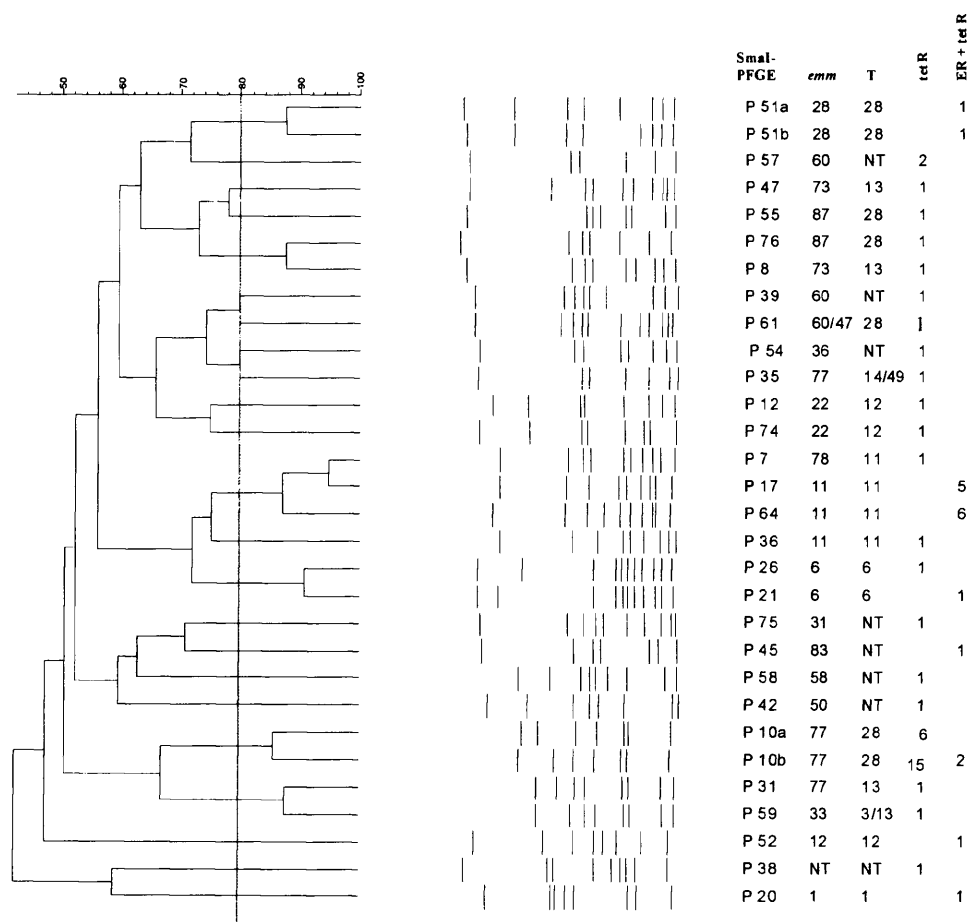


Figura 37. Dendograma de los pulsotipos obtenidos con la enzima de restricción *Sma*I para las cepas resistentes a tetraciclina.

7.3. Resistencia conjunta a eritromicina y tetraciclina

El 2,1 % (19 cepas) de las 898 cepas de SGA fueron resistentes a eritromicina y tetraciclina. Se observó que todas las cepas resistentes, excepto una (MLS_b i) presentaron el fenotipo MLS_b c de resistencia a macrólidos. Las CMI_s para eritromicina fueron ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$ para 18 cepas y de 32 $\mu\text{g/ml}$ para la cepa restante. Las CMI_s para clindamicina también mostraron valores ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$ en 14 de las 19 cepas. Las CMI_s para tetraciclina fueron de 16-64 $\mu\text{g/ml}$, estos datos se indican en la Tabla 61.

Tabla 61. Distribución de las CMI_s para las cepas de SGA resistentes a eritromicina y tetraciclina.

	n° cepas	51	130	274	148	4	1	3	9	63	56	60	42	57	898
Eritromicina	%	5,7	14,5	30,5	16,5	0,4	0,1	0,3	1,0	7,0	6,2	6,7	4,7	6,3	100,0
	n° cepas	170	232	273	163	5	1	3	0	1	0	0	0	50	898
Clindamicina	%	18,9	25,8	30,4	18,2	0,6	0,1	0,3	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	5,6	100,0

7.3.1. Correlación fórmula antigénica, cuadro clínico y resistencia conjunta a eritromicina y tetraciclina

Las 19 cepas resistentes a eritromicina y tetraciclina mostraron 7 fórmulas antigénicas, indicadas en la Tabla 62. *emm11T11* (57,9%) fue el serotipo más representativo con 11 cepas seguido por *emm28T28* (2 cepas) y *emm77T28* (2 cepas). Considerando el total de las 898 cepas de SGA es destacable que 11 cepas de *emm11T11* fueron resistentes a ambos antibióticos (Tabla 62 y Figura 38).

Tabla 62. Distribución de la fórmula antigénica y cuadros clínicos observados en las 19 cepas de SGA resistentes a eritromicina y tetraciclina, aisladas en España entre 1994-2006.

emm	T	nº cepas serotipo	F A S	S H O	C E L	S E P	R E S	O S E	G E N	O T I	C O N	E S C	F / A	P O R	cepas resistentes ER+TET	% cepas ER+TET/ serotipo
1	1	129					1								1	0,8
6	6	67						1							1	1,5
11	11	24			1	1			2	2			2	3	11	45,8
12	12	68											1		1	1,5
28	28	78			1			1							2	2,6
77	28	23			1					1					2	8,7
83	NT	1							1						1	
Total			0	0	3	1	1	1	4	3	0	2	4	0	19	

Abreviaturas: nº cepas serotipo: indica el número total de cepas que han presentado un serotipo concreto entre los 898 SGA. Los diferentes cuadros clínicos se indican con abreviaturas: Fascitis necrotizante (FAS), shock tóxico (SHO), celulitis (CEL), sepsis (SEP), infecciones óseas (OSE), infecciones genitales (GEN), otitis (OTI), conjuntivitis (CON), escarlatina (ESC), faringoamigdalitis (F/A), portadores (POR). % cepas ER+TET/serotipo: indica el porcentaje de cepas resistentes a eritromicina y tetraciclina en un serotipo concreto.

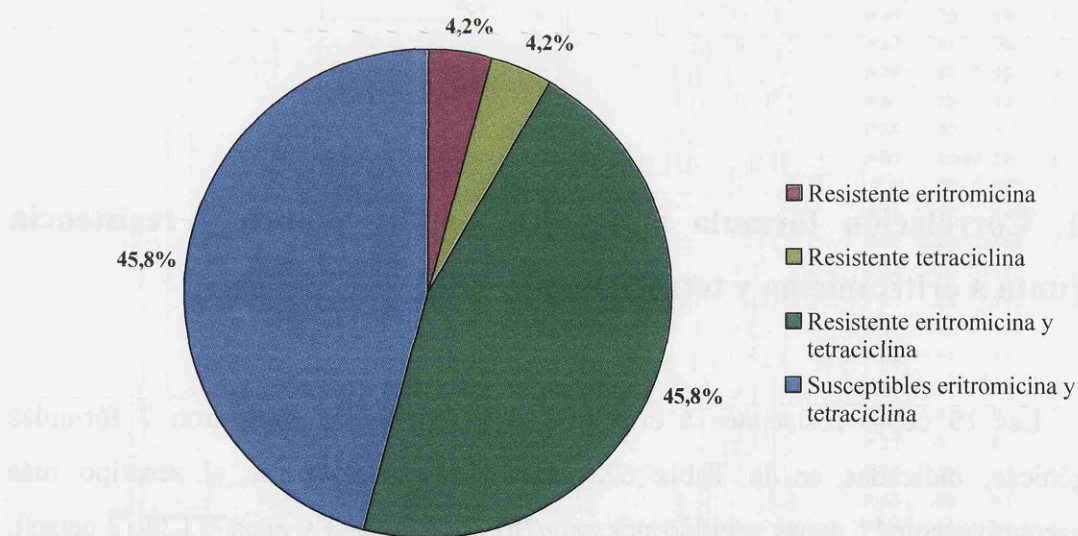


Figura 38. Representación de cepas de SGA *emm11T11* (n=24) aisladas entre 1994-2006, mostrando la susceptibilidad a eritromicina y tetraciclina.

7.3.2. Genes de resistencia conjunta a eritromicina y tetraciclina

Los genes de resistencia a macrólidos y tetraciclina, así como la fórmula antigénica, fenotipo y los pulsotipos observados con *Sma*I, se indican en la Tabla 63.

Tabla 63. Cepas de SGA resistentes a eritromicina y tetraciclina aisladas en España entre 1994-2006.

1	1	20	<i>erm(B) + msr(D) + mef(A/E)</i>	<i>tet(M) + tet(O)</i>	1
11	11	64	<i>erm(B) + msr(D) + mef(A/E)</i>	<i>tet(M) + tet(O)</i>	2
			<i>erm(B) + msr(D)</i>	<i>tet(M) + tet(O)</i>	1
			<i>erm(B)</i>	<i>tet(M)</i>	1
			<i>erm(B)</i>	<i>tet(M)</i>	1
			<i>erm(B) + erm(TR) + mef(A/E)</i>	<i>tet(M)</i>	1
11	11	17	<i>erm(B)</i>	<i>tet(M)</i>	3
			<i>erm(B) + erm(TR) + msr(D)</i>	<i>tet(M)</i>	2
12	12	52	<i>erm(B) + msr(D) + mef(A/E) + erm(TR)</i>	<i>tet(M)</i>	1
28	28	51a	<i>erm(B)</i>	<i>tet(M)</i>	1
28	28	51b	<i>erm(B) + erm(TR) + mef(A/E)</i>	<i>tet(M)</i>	1
6	6	21	<i>erm(B)</i>	<i>tet(M) + tet(O)</i>	1
77	28	10b	<i>erm(TR) + mef(A/E)</i>	<i>tet(M) + tet(O)</i>	1
			<i>erm(B) + erm(TR) + mef(A/E)</i>	<i>tet(M) + tet(O)</i>	1*
83	NT	45	<i>erm(B) + erm(TR) + mef(A/E)</i>	<i>tet(M)</i>	1
Total					19

*Todas las cepas presentaron un fenotipo MLS_b c excepto una cepa que fue MLS_b i.

Los genes de resistencia *erm(B)* y *tet(M)* fueron detectados en todas las cepas excepto en una (n=18). *tet(M)* fue el único determinante de resistencia a tetraciclina en 13 casos, mientras que en 6 fue simultáneamente detectado junto con *tet(O)*. El gen *tet(O)* no se detectó como único determinante de resistencia a tetraciclina en ninguna de las 19 cepas que presentaron resistencia conjunta (eritromicina+tetraciclina).

7.3.3. PFGE de cepas resistentes a eritromicina y tetraciclina

Se observó que todas las cepas resistentes a eritromicina+tetraciclina fueron digeribles con *Sma*I. El dendograma obtenido para los distintos perfiles se muestra en la Figura 39. Tras analizar los pulsotipos obtenidos frente al total del mismo perfil, se observó que el 100% (n=6) de las cepas con patrón *Sma*64 (*emm*11T11) fueron resistentes a ambos antibióticos.

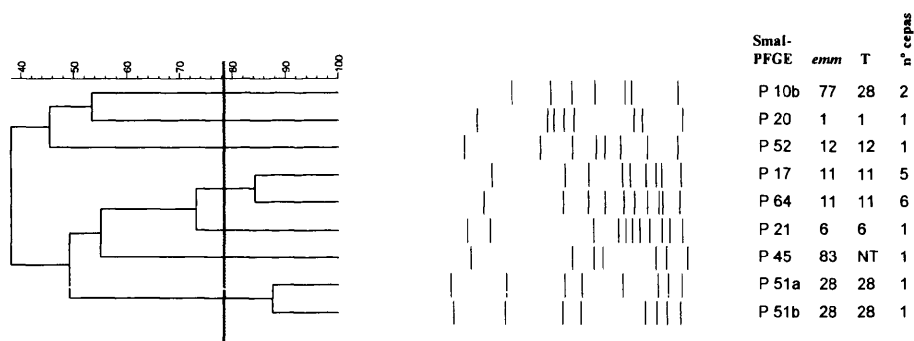


Figura 39. Dendograma de los pulsotipos obtenidos con la enzima de restricción *Sma*I para las cepas de SGA resistentes a eritromicina y tetraciclina.

7.4. Análisis mediante *Sma*-PFGE de cepas resistentes a eritromicina y/o tetraciclina

Se analizaron de manera conjunta todos los pulsotipos de las cepas resistentes a eritromicina y/o tetraciclina, en total fueron 337 cepas, de las cuales 276 fueron resistentes únicamente a eritromicina, 42 a tetraciclina y 19 a eritromicina+tetraciclina.

El dendograma obtenido para estas cepas se observa en la Figura 40.

Dice (Opt:1.00%) (Tol:1.2%-1.2%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
PFGE Sma-I

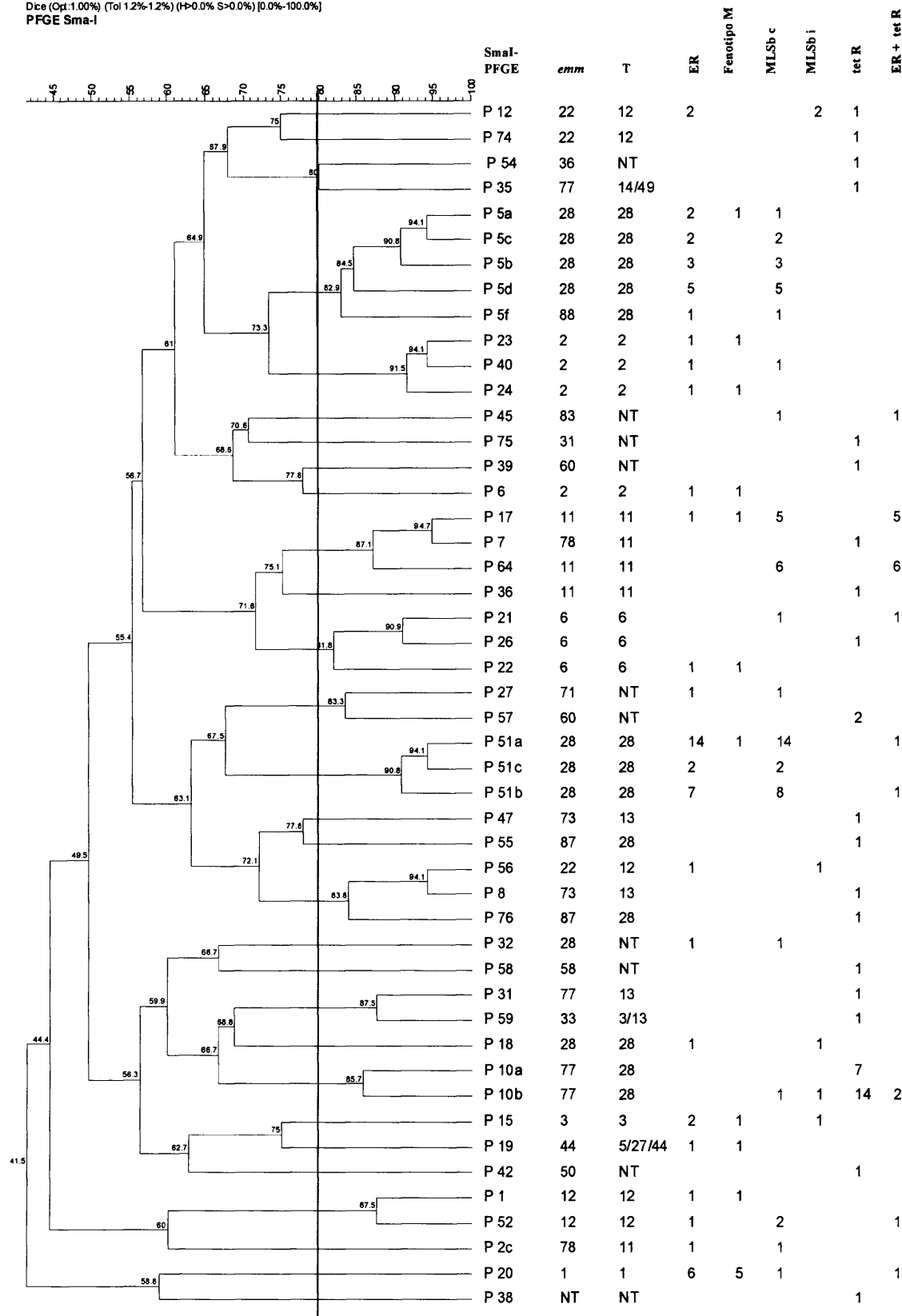


Figura 40. Dendrograma de los pulsotipos obtenidos con la enzima de restricción *Sma*I para las cepas de SGA resistentes a eritromicina y/o tetraciclina.

No se observó una agrupación en función de la resistencia a eritromicina, tetraciclina o ambas. Tampoco se observó agrupación según el fenotipo de resistencia a macrólidos como se comentó previamente, la agrupación fue en función del serotipo como se observó en el apartado de electroforesis en campo pulsado.

7.5. Análisis resistencia a rifampicina

El 0,3 % de las cepas de SGA fueron resistentes a rifampicina. Se detectaron 3 cepas resistentes, 2 procedieron de celulitis y presentaron las fórmulas antigénicas *emm*22T12 y *emm*9T9. La tercera cepa fue la única aislada de conjuntivitis y presentó el serotipo *emm*58TNT. *emm*22T12 y *emm*9T9 fueron responsables de un brote familiar que corresponde con el brote 5 indicado en el apartado 5. Las CMI_s observadas para cada una de las cepas se indican en la Tabla 64.

Se secuenció el gen *rpoB* de las 3 cepas resistentes a rifampicina y 2 cepas susceptibles a este antibiótico. Tras comparar las secuencias obtenidas se observaron 15 sitios polimórficos, todos presentaron sustituciones de bases que no tuvieron efecto a nivel proteico, exceptuando dos de ellas. Se identificó un cambio aminoacídico de una serina por una leucina, Ser482-Leu (equivalente a Ser522 de *Escherichia coli* y Ser421 de *Streptococcus pneumoniae*). El otro cambio aminoacídico se identificó en la posición 486, sustituyéndose histidina por asparagina, His486-Asn (equivalente a His526 de *Escherichia coli* y Ser425 de *Streptococcus pneumoniae*). Esta sustitución no fue identificada entre las cepas sensibles a rifampicina. Los diferentes cambios aminoacídicos identificados para las tres cepas resistentes a rifampicina se muestran en la Tabla 64.

Tabla 64. Características de cepas de *S. pyogenes* resistentes a rifampicina. * mutación secuenciada e identificada por Herrera y cols. (Herrera, 2002).

<i>emm</i> 2T2	>32	Ser482-Leu	TCA-TTA	Ser522*
<i>emm</i> 9T9	>32	His486-Asn	CAC-AAC	His526*
<i>emm</i> 58NT	>32	His486-Asn	CAC-AAC	His526

7. COBERTURA VACUNAL

Con la información recopilada sobre los serotipos M en España, se analizó la cobertura de la vacuna 26 multivalente para *S. pyogenes* en nuestro país. Los 26 serotipos frente a los que actúa la vacuna son (introducción apartado 5.1): 24, 5, 6, 19, 29, 14, 1, 12, spa, 28, 3, 1.2, 18, 2, 43, 94, 22, 11, 59, 33, 69, 101, 77, 114, 75, 76 y 92.

En España se observaron 39 serotipos *emm* y la vacuna actuaría sobre 13 de ellos. De modo que el espectro de actuación de la vacuna sería del 33, 3% para los serotipos españoles, frente al 66,7% restante sobre el que no sería efectiva. En la Tabla 65 se indican los serotipos españoles que cubriría la vacuna.

Al tener en cuenta el nº total de cepas, la vacuna actuaría frente al 63% de la población estudiada.

Tabla 65. Genes *emm* descritos en 898 cepas españolas de SGA entre 1994 y 2006, en color gris se indican los serotipos que cubriría la vacuna 26 multivalente.

4	137	18	4
1	129	79	3
28	80	50	2
3	72	62	2
12	69	94/13	2
6	67	5	1
87	50	29	1
75	46	33	1
2	41	36	1
77	31	48	1
78	30	63	1
9	27	64	1
11	24	71	1
44	20	81	1
22	13	83	1
73	11	88	1
58	6	92	1
84	6	31/13	1
89	6	64/52	1
60	5	NT	1

DISCUSIÓN

1. Características antigénicas de las cepas de *S. pyogenes* circulantes en España entre 1994-2006

Tras el análisis de una muestra amplia de cepas de *S. pyogenes* (898) procedentes de 75 laboratorios de casi todas las Comunidades Autónomas (Figura 18), se identificaron 39 genes *emm* (proteína M). Los cinco genes *emm* más frecuentes englobaron el 54,2% mientras que si consideramos los 10 primeros englobamos hasta el 80,4% de las cepas estudiadas. Esta acumulación de casos en unos pocos serotipos es similar a la encontrada en la mayoría de los países, en los que también se detectaron variedad de serotipos como se observa en la tabla 6 bis.

En países europeos se han detectado entre 19 y 45 tipos *emm* diferentes (Bidet, 2007; Luca-Harari, 2008b), algunos de ellos mostrados en la tabla 6 bis. En dos estudios europeos en los que intervinieron 12 y 11 países, se observaron 43 y 104 tipos *emm* respectivamente (Luca-Harari, 2009; Schmitz, 2003).

En países no europeos la diversidad de tipos *emm* de SGA fue similar a la encontrada en Europa (tabla 6 bis), así en Nueva Caledonia (archipiélago de Oceanía) se han descrito 28 tipos *emm*, en países de Asia como China y Nepal 24 y 45 tipos respectivamente (Ma, 2009; Sakota, 2006). En América (México, Hawaii y Norte Estados Unidos) se han descrito entre 27 y 33 tipos *emm* (Espinosa, 2003; Shulman, 2004), mientras que en Canadá se han detectado 54 proteínas M diferentes mediante técnicas serológicas (Tyrrell, 2002).

Entre las cepas españolas de SGA analizadas, el serotipo *emm4* (15,3%) fue el más prevalente seguido de *emm1* (14,4%), *emm28* (8,9%), *emm3* (8,0%) y *emm12* (7,7%). Todos los serotipos anteriores exceptuando *emm28* han sido descritos como responsables del 50 % de los cuadros clínicos producidos por *S. pyogenes* en Europa según el programa de vigilancia Strep-EURO, en el cual no participó España (Creti, 2007).

Tabla 6bis. Descripción de los serotipos de *S. pyogenes* más frecuentes en diferentes países

País	Año	n° cepas	Origen ^a	n° tipos <i>emm</i> _b	Serotipos M _c	Referencia
Europa (12 países)	1997-2000	202	INV	43	1, 3, 28, 12, 22, 89, 6, 81, 83	Schmitz, 2003
Europa (11 países)	2003-2004	4353	INV	104	1, 28, 3, 89, 87, 12, 4, 83, 81, 5	Luca-Harari, 2009
Alemania	1996-2002	464	INV	45	1, 3, 4, 6, 11, 12, 28, 75, 77, 89	Wahl, 2007b
Dinamarca	2003-2004	278	INV	29	28, 1, 3, 89, 12	Luca-Harari, 2008a
Francia	2007	625	INV	48	1, 89, 28	Doloy, 2008
Grecia	2003-2006	943	ENF otros	NE	173 eriR: 12, 77, 4, 1, 28. 770 eriS: 1, 12, 4, 28, 77.	Michos, 2009
Italia	1994-2005	207	INV	32	1, 4, 12, 89	Creti, 2007
Países Bajos	1994-2003	1504	INV	28	1, 3, 89, 28, 12, 6	Vlaminckx, 2005
Rusia	2006	190	INV NO INV	NE	INV: 12, 25 NO INV: 74	Martynova, 2008
China	1993-1994	137	ENF y otros	24	3, 1, 4, 12, st1815, 6	Ma, 2009
China	2005-2006	222	ENF y otros	9	12, 1	Ma, 2009
Nepal	1998-1999	120	ENF y EP	45	1, 4, 11, 22	Sakota, 2008
Canadá	1993-1999	4760	INV	54	1, 12, 28, 3, 4, 11, 89, 6, 2, 77	Tyrell, 2002
Canadá	2000-2006	6796	INV	NE	1, 12, 3, 4, 5, 77, 89, 11, 91, 6	Tyrell, 2008
Estados Unidos	2000-2004	5400	INV	NE	1, 3, 28, 12, 89	O'Loughlin, 2007
Hawái	2005-2007	96	INV	33	90, 44, 73	Erdem, 2008
Nueva Caledonia	2006	91	INV	28	15, 92, 106	Hello, 2008
España	1994-2006	898	INV NO INV	39	4, 1, 28, 3, 12, 6, 87, 75, 2, 77	Nuestro estudio

a INV: enfermedad invasiva; NO INV: enfermedad no invasiva; ENF: exudado nasofaríngeo; EP: exudado piel/ b NE: no especificado/ c N° tipos *emm*: Indica el número total de serotipos M descritos en el estudio; eriR: resistente a eritromicina; eriS: sensible a eritromicina/ d Serotipos M: Se indican los serotipos M más frecuentes por orden de prevalencia

En la mayoría de los países europeos *emm1*, 3, 12 ó 28 preceden al serotipo *emm4*, desplazándose este último a la tercera y cuarta posición en Francia, Grecia, Holanda o Alemania (Bidet, 2007; Stathi, 2008; Wahl, 2007b). El serotipo *emm4* se describe en sexta posición en el programa de vigilancia Strep-EURO, en el cual participaron 11 países y se analizaron 4353 cepas (Luca-Harari, 2009). Se observa una baja incidencia de *emm4* en Dinamarca, Polonia y Noruega (Luca-Harari, 2008a; Szczypa, 2006).

emm1 (14,4%) y *emm3* (8,0%), segundo y cuarto serotipos predominantes en nuestro estudio, han sido descritos como los principales causantes de enfermedades invasivas graves de SGA en países industrializados. No está claro si estos serotipos predominan en cuadros invasivos porque son hipervirulentos o porque se encuentran entre los aislados más prevalentes en la comunidad (Aziz, 2008). En la mayoría de los países en los que se ha revisado la epidemiología de SGA, *emm1* ocupa una posición privilegiada como serotipo predominante en Europa, Estados Unidos, Canadá y países asiáticos como China o Nepal. La posición en cuanto al resto de serotipos suele variar levemente entre diferentes estudios de un mismo país (O'Loughlin, 2007; Sakota, 2006; Schmitz, 2003).

emm28 (8,9%) fue el tercer serotipo más frecuente en nuestro estudio. Se ha observado un aumento de este serotipo en países del norte de Europa, predominando en Dinamarca y Finlandia (Luca-Harari, 2008a; Siljander, 2006). En las cepas estudiadas *emm28* superó incluso a *emm3* (8,0%). Algo similar se observa en un estudio de 586 cepas invasivas realizado en Alemania, en el cual *emm28* constituye el 18,3% de las cepas frente al 9,6% de *emm3* (Imöhl, 2008).

La tendencia de los genes *emm* más frecuentes en las cepas españolas es similar a países de la unión europea como Alemania (*emm1*, 3, 4, 6, 11, 12), Italia (*emm1*, 12, 3 y 4), Países Bajos (*emm1*, 3, 89, 28, 12, 6) e incluso Canadá (*emm1*, 12, 28, 3, 4, 11) o Estados Unidos (*emm1*, 3, 28, 12, 89). Exceptuando el serotipo *emm4*, que como se ha comentado anteriormente fue el más prevalente entre las cepas españolas estudiadas (Creti, 2007; O'Loughlin, 2007; Wahl, 2007a, 2007b). Esta distribución de serotipos parece estar más alejada de países como Nueva Caledonia (*emm15*, 92 y 106) o Hawai (*emm90*, 44 y 73) (Erdem, 2008; Hello, 2008).

En España existen pocos estudios sobre la distribución de los serotipos *emm* y T circulantes a nivel global. Las descripciones de diversos autores constan de un número

limitado de cepas restringidos a un área geográfica concreta, siendo la mayoría estudios de susceptibilidad a antibióticos o casos clínicos. Desde nuestro conocimiento uno de los pocos trabajos españoles en los que se estudia la distribución de serotipos de SGA es el realizado por Rivera y cols en 2006. Se analizaron 27 cepas invasivas y 99 no invasivas del hospital de Santa Creu en Barcelona. Se describe *emm1* como el serotipo más prevalente seguido de *emm3*, *emm4*, *emm12* y *emm28* (Rivera, 2006), contrastando de nuevo con el predominio de *emm4* en nuestras cepas.

En cuanto al antígeno T, se identificaron 16, de los cuales los cinco más frecuentes constituyeron el 64,0% de la población estudiada. El número de serotipos T detectados han sido más elevados en Rumania (27), Grecia (36) o el proyecto Strep-EURO (50) (Koliou, 2007; Luca-Harari, 2008b, 2009).

Un 7,1% de SGA no fueron tipables mediante serología. En EEUU, Tailandia o Malasia las cepas de SGA no tipables (NT) ascienden a 11,0%, 40,0% y 60,0%, respectivamente (Koliou, 2007). Sin embargo, en nuestro país vecino Francia, el 7,0% de las cepas resultaron ser NT como en nuestro caso (Loubinoux, 2004). En Strep-EURO se describe un 10,0% de NT entre 11 países europeos (Luca-Harari, 2009).

Los antígenos T más frecuentes en nuestro estudio fueron T28 (17,6%), T4 (15,3%), T1 (14,4%), T12 (9,2%) y T6 (7,5%). La mayoría de estos antígenos se observaron entre los prevalentes en Dinamarca (T28, 1, 3/13/B3264), Finlandia (T28, B3264, 1, 8 y 12), Noruega (T1, 3 y 28) o el proyecto Strep-EURO (T1, 28, 3/13/B3264, 12, 4, 5, 6, 11, 8/25/Imp19), variando el orden en función del país (Luca-Harari, 2008a; Meisal, 2008; Siljander, 2006).

Además de observarse el predominio de T28 entre las cepas españolas, ha sido descrito en Dinamarca, Finlandia o la isla de Chipre. T4 fue el segundo antígeno T más frecuente, al igual que ocurría con *emm4*. En los estudios de vigilancia de otros países no se encuentra entre los antígenos T más comunes. En un estudio francés, T4 se describe en la quinta y sexta posición en aislados de enfermedades invasivas y no invasivas, con un 7,0% de representación en ambas (Loubinoux, 2004).

El antígeno T es importante en la investigación epidemiológica de los aislados de SGA, ya que puede diferenciar cepas con el mismo gen *emm*. Por tanto, la correlación proteína T y gen *emm* permite estudiar la diversidad de las cepas de SGA.

La asociación de un tipo T concreto con varios genes *emm* fue más frecuente que la asociación de un tipo *emm* concreto con varios tipos T. T28 fue el antígeno T que se asoció con más tipos *emm*, observándose con *emm*28, 87, 77 y 60.

Los 16 antígenos T y 39 genes *emm* detectados, mostraron 48 combinaciones antigénicas (*emm*-T). En Strep-EURO se han llegado a identificar hasta 314 combinaciones *emm*-T (Luca-Harari, 2009).

La combinación más frecuente en nuestro estudio fue *emm*4T4 (15,3%), seguida por *emm*1T1 (14,4%), *emm*28T28 (8,7%), *emm*12T12 (7,6%) y *emm*6T6 (7,5%). Como se puede observar la distribución coincide con la descrita para el gen *emm* de forma individual, porque como se ha comentado, la asociación de un tipo *emm* concreto con varios tipos T es poco frecuente. La única excepción fue *emm*3 (8%), cuarto gen *emm* más frecuente, en este caso no se observa entre las cinco combinaciones más frecuentes porque se observó asociado con tres antígenos T: *emm*3T3 (2,9%) , *emm*3TNT (4,6%) y *emm*3T3/13 (0,6%). Sin embargo, se observó que estas tres combinaciones eran el mismo clon, ya que presentaban el mismo pulsotipo, indicándonos que en un número importante de cepas *emm*3 no se detecta o no se expresa el antígeno T.

En España se han descrito *emm*4T4 y *emm*1T1 asociados con brotes de enfermedades invasivas en Cantabria, isla de Gran Canaria y País Vasco (Aguero, 2008; Castells, 2007; Medina-Gens, 2005). Los serotipos *emm*4T4, *emm*6T6, *emm*28T28 y *emm*73T13, se han observado en un brote familiar. Este brote familiar fue estudiado en nuestro laboratorio y corresponde con el brote 6 descrito en resultados (Mazon, 2003).

Los serotipos *emm*12T12, *emm*4T4, *emm*75T8.25, *emm*11T11, *emm*28T28, *emm*77T28, *emm*22T12 se han identificado en España como clones asociados con resistencia a macrólidos (Alberti, 2003; Montes, 2006; Perez-Trallero, 1999, 2004, 2007).

*emm*4T4 se ha descrito como frecuente en aislados resistentes a eritromicina con fenotipo M en España y en diversos países como Inglaterra, Italia o Finlandia. De hecho en 1999 Perez-Trallero y cols (Perez-Trallero, 1999) describieron 2 clones circulantes de *emm*4T4 en España. En nuestro caso el 84,7% de las cepas *emm*4T4 fueron resistentes a eritromicina, de modo que podríamos plantear que varios clones *emm*4T4 asociados con resistencia a eritromicina podrían estar desplazando al serotipo mayoritario *emm*1T1.

2. Control de la infección. Cobertura vacunal en nuestro medio, en función de los tipos T y *emm* predominantes en España

Como se comenta en la introducción el desarrollo de una vacuna frente a SGA se encuentra en fase de experimentación, siendo la principal candidata una vacuna multivalente frente a 26 tipos *emm* (Smeesters, 2008). Los 26 serotipos frente a los que actuaría la vacuna son : 24, 5, 6, 19, 29, 14, 1, 12, spa, 28, 3, 1.2, 18, 2, 43, 94, 22, 11, 59, 33, 69, 101, 77, 114, 75, 76 y 92 (Hu, 2002; McNeil, 2005).

Esta vacuna cubre el 80-90% de los serotipos productores de faringitis y enfermedades invasivas en EEUU (Cohen-Poradosu, 2007). Sin embargo, en el caso de las cepas de SGA españolas, la vacuna multivalente sólo cubriría el 33,3% de los serotipos.

Teniendo en cuenta el número total de las cepas estudiadas, la vacuna sería capaz de actuar frente al 63,0% de los casos. Estos resultados no parecen ser prometedores para el uso de la vacuna en España. Su espectro de actuación podría aumentar hasta el 78,3% incluyendo el serotipo *emm4*. Este serotipo resultó ser el más frecuente en nuestro estudio y sería imprescindible su inclusión en la vacuna. Incluyendo otros tres serotipos frecuentes, el espectro de actuación aumentaría hasta un 90,2%. Con la inclusión de *emm87* la cobertura aumentaría al 83,9%, con *emm78* hasta un 87,2% y finalmente con *emm9* hasta el 90,2%.

Por tanto, el uso de la vacuna 26 multivalente no sería demasiado útil en España ya que no cubre serotipos altamente implicados en la patología de nuestro medio como son *emm4*, *emm87*, *emm78* ó *emm9*. Para poder usar este tipo de vacuna en España deberían incluirse estos serotipos frecuentes, simplemente con *emm4* el espectro de actuación mejora notablemente.

3. Distribución de los tipos antigénicos en los cuadros clínicos producidos por SGA

Como previamente se ha descrito *S. pyogenes* produce un amplio rango de enfermedades, desde infecciones leves a infecciones muy graves que pueden ocasionar la muerte. La escarlatina fue el cuadro clínico más frecuentemente encontrado entre las cepas españolas estudiadas. Este cuadro clínico presenta una severidad bastante variable, pudiendo ser extrema en casos de muerte fulminante. En la actualidad gracias a los tratamientos antibióticos es raro este tipo de desenlace (Cartwright, 1997).

En las últimas cinco décadas, se ha producido una disminución en la incidencia de las enfermedades producidas por SGA. En los años 70, los datos eran tan optimistas que se llegó a pensar en la casi erradicación de enfermedades graves en países industrializados, aboliendo la notificación de enfermedades como la escarlatina en muchos países europeos. Sin embargo, en 1980 resurgieron los brotes de fiebre reumática y enfermedades sistémicas con cierta similitud a las epidemias de escarlatina de los siglos XIX y principios del siglo XX (Duncan, 2000; Efstratiou, 2000).

Las descripciones de escarlatina son diversas en diferentes partes del mundo (Chiou, 2004, 2009; Czarkowski, 2008; Feeney, 2005; Hoebe, 2000). En España se ha apreciado un aumento en el diagnóstico de escarlatina con un desplazamiento de dicha enfermedad hacia edades más precoces (Sevilla, 2003).

En numerosas ocasiones la escarlatina aparece asociada con brotes en guarderías y colegios, existiendo en España diferentes descripciones de este tipo (Giner, 2004). En nuestro estudio, se identificaron 7 brotes de escarlatina, 3 de ellos en el ámbito escolar en diferentes colegios de la Comunidad Valenciana.

La celulitis/infecciones de piel (18,2%) y faringitis (18,0%), fueron los dos cuadros clínicos más frecuentemente encontrados después de la escarlatina. En general las infecciones cutáneas y celulitis suelen ser bastante frecuentes entre los aislados de diferentes países. En un estudio sueco se han llegado a describir hasta un 70,4% de casos de infecciones de piel y tejidos blandos (Darenberg, 2007), en Estados Unidos datos del 37,1% entre 1995-1999 y de 36,4% entre 2000-2004 (O'Brien, 2002; O'Loughlin, 2007). Un 34,0% de celulitis fueron observadas en Reino Unido, en Dinamarca un 26,0% produjeron infecciones de piel y tejidos blandos, mientras que en

Canadá un 17,0% presentó celulitis (Lamagni, 2008b; Luca-Harari, 2008a; Tyrrell, 2005).

El 17,4 % de las enfermedades producidas por SGA en España fueron invasivas graves: sepsis (7,5%), shock tóxico (5,1%) y fascitis necrotizante (4,8%), que como se comentó anteriormente, comenzaron a resurgir en los últimos 30 años. Los datos obtenidos en otros países presentan pequeñas variaciones con respecto a los españoles. En el caso del síndrome de shock tóxico su representación osciló entre 5-11 % en Canadá, Estados Unidos, Dinamarca, Reino Unido o Suecia (Darenberg, 2007; Lamagni, 2008b; Luca-Harari, 2008a; O'Brien, 2002; Tyrrell, 2005).

El aumento de estas enfermedades invasivas ha ocasionado un incremento de brotes, entre nuestras cepas se han descrito 7 brotes asociados con enfermedades invasivas (Tabla 33): fascitis necrotizante, celulitis, síndrome de shock séptico (3 brotes) y sepsis (2 brotes). Uno de los brotes de síndrome de shock séptico ocurrió en la isla de Gran Canaria, entre los meses de febrero y abril de 2004, atribuible a un mismo clon de SGA *emm1T1*. Se diagnosticaron 4 pacientes con bacteriemia en un periodo de 39 días, que fallecieron a consecuencia de SSTS (Medina-Gens, 2005).

emm1 y *emm3* han sido asociados con enfermedades invasivas, aunque esta relación no está del todo clara como se comentó en el apartado anterior (Aziz, 2008; Schmitz, 2003). Sin embargo, en un estudio del proyecto Strep-EURO, se observa que la tasa de mortalidad asociada con *emm1* y *emm3* en STSS, fascitis necrotizante o sepsis puerperal, excede a la originada por otros serotipos, demostrando que estos dos tipos *emm* son particularmente virulentos (Luca-Harari, 2009). Las cepas *emm1T1* españolas aparecieron asociadas con algunas enfermedades invasivas (fascitis necrotizante, shock tóxico y sepsis). Sin embargo, también predominaron en otitis e infecciones respiratorias. En función de estos resultados podríamos afirmar que *emm1T1* aparece más frecuentemente asociado con cuadros invasivos, de hecho es importante destacar que la mayoría de las infecciones respiratorias fueron infecciones profundas como neumonía y empiema. En el trabajo anteriormente citado del proyecto Strep-EURO, se observa un predominio de *emm1* en el STSS y en la fascitis necrotizante (Luca-Harari, 2009).

El gen *emm3* fue más frecuente en escarlatina aunque también se encontró en enfermedades invasivas.

Los serotipos *emm28T28*, *emm77T28* y *emm2T2* se encontraron más frecuentemente asociados con celulitis e infecciones de piel, que con el resto de cuadros clínicos. Se ha descrito que la presencia de *emm28* es elevada en casos de sepsis puerperal e infecciones neonatales (Green, 2005; Luca-Harari, 2009). En nuestro estudio la mayoría de las celulitis fueron perianales en niños, lo que podría explicar el predominio del serotipo *emm28*. En el caso de *emm2* se ha descrito su asociación con sepsis puerperal pero desde nuestro conocimiento no se ha descrito su asociación con celulitis (Green, 2005).

En nuestro estudio la fórmula antigénica *emm4T4* se asoció claramente con escarlatina. Esta combinación ha sido previamente relacionada con esta infección en varios trabajos (Cartwright, 1997; Chiou, 2004, 2009), describiéndose como predominante en aislados de escarlatina en Taiwan entre 1996-1999 (Chiou, 2004). También existen numerosas descripciones de brotes de escarlatina ocasionadas por *emm4T4* (Aguero, 2008).

emm1, *emm3*, *emm6* y *emm12* han sido relacionados con este cuadro clínico en otros estudios (Cartwright, 1997; Chiou, 2009; Feeney, 2005; Shulman, 2004). En nuestro caso no hemos observado esta asociación excepto para el serotipo *emm3NT* que presentó un 46,0% de cepas aisladas de escarlatina.

El predominio de *emm9T9*, *emm44T5/27/44* y *emm87T28* en cepas aisladas de escarlatina, podría estar indicando una asociación entre estas combinaciones y escarlatina. Entre la bibliografía analizada no se han observado descripciones de este tipo.

El 71,8% de las cepas españolas *emm75T25* fueron aisladas de faringoamigdalitis. En un trabajo australiano previo, se describe la prevalencia de *emm75T25* en este cuadro clínico, con valores del 21,0% (Rogers, 2007).

Por tanto, se observa cierta correlación entre la fórmula antigénica (*emm-T*) y el cuadro clínico, como se describe en otros estudios (Luca-Harari, 2009).

4. Estudio de la clonalidad de las cepas de SGA y su correlación con la combinación antigénica

El análisis mediante *Sma*-PFGE mostró una gran heterogeneidad entre las cepas de SGA, presentado un rango de similitud de 42,6%-100,0%. Se observó diversidad genética entre las cepas de un mismo serotipo, hecho previamente descrito en la bibliografía (Aziz, 2008). No obstante, la mayoría de los serotipos estudiados mostraron clonalidad.

emm1T1 mostró ser bastante clonal ya que el 94,7% de las cepas presentaron el pulsotipo *Sma20* y el otro perfil observado, *Sma41*, presentó un 93,3% de similitud con respecto al anterior. Este alto grado de relación genética en *emm1T1* ha sido previamente observado en diversos estudios, entre ellos un estudio canadiense (Chatellier, 2000).

Entre *emm3T3*, *emm3TNT* y *emm3T3/13* se observó el mismo pulsotipo (*Sma15*) en el 97,2% de las cepas, indicando que eran el mismo clon.

emm1 y *emm3* derivan de un número limitado de clones ancestrales lo que podría explicar la clonalidad de estos serotipos (Schmitz, 2003; Vlamincx, 2003).

emm1T1 es el serotipo más frecuentemente aislado en el mundo, un subclon que ha persistido globalmente más de un cuarto de siglo. De hecho se ha demostrado que la mayoría de las diferencias genéticas entre los clones *emm1T1* ($\approx 5\%$ divergencia) se debe a la inserción de fagos en su cromosoma (Aziz, 2008; Schmitz, 2003; Vlamincx, 2003).

emm11T11, *emm77T28* y *emm78T11* fueron muy clonales, más del 95 % de sus cepas se consideraron genéticamente relacionadas ($\geq 80\%$ similitud), lo que indica que no han sufrido demasiados cambios genéticos, al menos durante el periodo de estudio.

En *emm6T6*, que en un principio pareció presentar bastante variabilidad genética se observó cierta clonalidad, pudiéndose definir 2 grupos principales. Uno estaría formado por los patrones *Sma4*, *Sma21*, *Sma22* y *Sma26* que mostraron más de un 80,0 % de similitud y constituyeron el 58,2 % de las cepas *emm6T6*. El otro grupo formó parte del 40,3 % de *emm6T6* que no fueron digeribles con *SmaI* y produjeron el mismo patrón de bandas al ser digeridos con la enzima *SfiI* (*SfiI*7).

emm28T28 y *emm87T28* presentaron mayor variabilidad que el resto de combinaciones antigénicas. Para *emm28T28* se podrían definir 6 grupos clonales con *SmaI*, el 41,0 % formó un grupo constituido por los patrones *Sma5a*, *Sma5c* y *Sma5d* cuya similitud fue de un 83,0 %. El 15,4 % lo formaron *Sma5b* y *Sma5e* con una similitud del 94,1 %. Estos dos grupos están muy relacionados ya que su similitud fue de un 79,1 %. Otro grupo estaría definido por los perfiles *Sma51a*, *Sma51b* y *Sma51c* que constituyeron el 38,5 % de *emm28T28* y presentaron una similitud de 90,81%. Los otros tres perfiles restantes constituirían grupos aparte. En el caso de *emm87T28* se pudieron definir hasta 5 grupos diferentes.

Este grado de heterogeneidad en *emm28* y *emm87* ha sido previamente descrito por Vlaminckx y cols. al igual que para *emm9* y *emm12* (Vlaminckx, 2007). En nuestro caso la tendencia de *emm9* parece ser bastante clonal, ya que el 92,6% presentaron el mismo pulsotipo, en el caso de *emm12T12* el 75,0% presentó más de un 80,0% de similitud.

Se ha descrito que *emm28* y *emm12* derivan de múltiples clones (Vlaminckx, 2007), lo que podría explicar la variabilidad de *emm28T28* observada entre nuestras cepas. En el caso de *emm12T12* no se observó tanta variabilidad como para *emm28*, ya que el 72,1% de las cepas fueron *SmaI*. No obstante, se observaron otros 5 grupos, dos definidos por *SmaI* y los tres restantes obtenidos con *SfiI*.

Un elevado porcentaje de cepas de SGA (24,2%) no fueron digeribles con *SmaI*, sobre todo *emm4T4* y *emm75T25*. Por este motivo utilizamos *SfiI* (Perez-Trallero, 1999) que nos permitió establecer patrones en todas las cepas no digeribles (ND). La representación de cepas ND fue muy elevada en los serotipos *emm4T4* y *emm75T25*, con valores del 84,7% y 93,5% respectivamente. Como veremos posteriormente esta refractariedad de *emm4T4* frente *SmaI* se ha asociado con resistencia a macrólidos.

emm75T25 fue bastante clonal, el 89,1% presentó el pulsotipo *Sfi12*.

Por otro lado, en *emm4T4* pudimos observar dos grupos mayoritarios, un grupo definido por *SmaI* con un 87,5% de similitud entre sí (*Sma3* y *Sma1I*) y otro grupo definido por *SfiI* (*Sfi1* y *Sfi2*), este último supuso el 67,2% de las cepas *emm4T4*. No obstante, se observaron hasta otros 8 grupos más, indicando que aunque la mayor parte de *emm4T4* pertenecen a dos grupos clonales, se observa cierta variabilidad.

5. Estudio del perfil de 10 genes de toxinas implicados en la virulencia y análisis de su relación con los serotipos y cuadros clínicos más graves

En nuestro estudio, se han detectado 119 combinaciones de genes que codifican toxinas estreptocócicas. El número de perfiles descritos en la bibliografía es mucho menor, en estudios suecos se han registrado datos de 38 y 48 perfiles (Maripuu, 2008).

De 1 a 3 genes que codifican toxinas fueron detectados en el 11,8% de las cepas españolas (106). Teniendo en cuenta que se estudiaron 10 genes, en estos casos nos planteamos que la PCR puede no haber sido efectiva. Entre las posibles causas descritas podría influir la presencia de polimorfismos en los sitios de unión de los cebadores que podría afectar al proceso de amplificación, en genes como *smeZ*, altamente polimórfico (Commons, 2008).

speB y *speF* son genes cromosómicos, por tanto, se han identificado en la mayoría de los aislados de SGA descritos en la bibliografía (Bianco, 2006; Kruco, 2007; Louie, 1998; Luca-Harari, 2008a, 2008b; Rivera, 2006; Stathi, 2008; Szczypa, 2006; Tyler, 1992). En nuestro estudio la incidencia de *speB* fue similar, presentándolo el 93,3% de las cepas, sin embargo, en el caso de *speF* los valores fueron algo menores (80,6%).

Como se comentó en la introducción, el papel de *speB* como superantígeno es controvertido. En 1934, *speB* fue descrita como una toxina de SGA. En estudios posteriores se demostró que es una cisteína proteasa producida por todos los estreptococos del grupo A (Cunningham, 2000). En la actualidad parece ampliamente aceptado que *speB* no es un superantígeno (Fleischer, 1995; Lintges, 2007; Proft, 2007), por tanto, en muchos estudios realizados a partir del 2000 no se incluye este gen en el análisis de toxinas estreptocócicas.

speB fue introducido en nuestro estudio en 1994 y actualmente se continúa con su detección. La mayoría de las cepas de SGA presentan este gen, de modo que sería interesante realizar estudios de expresión, ya que aunque no se considera un superantígeno presenta un papel importante en la patogénesis de SGA (ver introducción 2.3.3.6) (Proft, 2007).

En el caso de *speF* ocurrió algo similar a lo sucedido con *speB*. Fue descrito como un factor mitógeno y posteriormente se demostró que no contribuía

significativamente a la actividad superantigénica de SGA. *speF* no parece ser un factor crítico de virulencia y en la mayoría de estudios actuales no se estudia (Sriskandan, 2000).

No se encontraron diferencias en cuanto al cuadro clínico o serotipo entre las cepas españolas que presentaron presencia o ausencia de *speB* y *speF*.

speG también es un gen cromosómico, en la mayoría de los estudios descritos se ha detectado en el 90,0-100,0% de SGA (Luca-Harari, 2008a, 2009; Schmitz, 2003). En nuestro caso fue detectado en el 83,4% de las cepas, datos similares a los encontrados por Rivera y cols. (84,1%) (Rivera, 2006). En Japón hay descripciones del 78,0% (Commons, 2008).

La detección de *smeZ* fue de 90,0-100,0% en Australia, Suecia, Nueva Zelanda, Inglaterra y Países Bajos (Commons, 2008; McMillan, 2006). En España se observó una representación del 91,7% en un estudio realizado en Barcelona con 126 aislados (Rivera, 2006). Sin embargo, en nuestro caso *smeZ* se detectó en el 35,6% de las cepas, datos que se asemejan más a los presentados por Schmitz y cols. (30,8%) o Vlamincx y cols. (32,0%) (Schmitz, 2003; Vlamincx, 2003), en los que se estudiaron 292 aislados de 12 países europeos y 170 cepas invasivas holandesas, respectivamente.

En cuanto a la representación de *speC*, *ssa*, *speJ*, *speH* y *speA*, los datos disponibles son más heterogéneos (Commons, 2008; Luca-Harari, 2008a, 2008b; Ma, 2009; Maripuu, 2008; McMillan, 2006; Rivera, 2006; Wahl, 2007b).

La detección de *speI* en SGA suele ser baja, observándose en un 0,0% y 17,0% de los aislados (Commons, 2008; McMillan, 2006), en las cepas españolas fue detectado en el 12,0%.

speH y *speI* se sitúan en el mismo bacteriófago, de modo que a menudo aparecen en la misma cepa. No obstante, se han descrito casos en los que *speH* y *speI* no se detectan conjuntamente, sugiriéndose la pérdida de *speI* durante la integración del bacteriófago en el genoma o la existencia de un fago con *speH* de forma individual (Commons, 2008). 82 cepas presentaron *speI*, de las cuales 72 aparecieron asociadas con *speH*, por tanto en estos casos podemos sugerir la presencia de este bacteriófago. Por otro lado se han detectado 39 cepas con *speH* independientemente de *speI*, confirmando que estos genes pueden aparecer por separado.

speA se ha relacionado con enfermedades invasivas como el síndrome de shock tóxico estreptocócico (STSS)(Vlaminckx, 2003). Weeks y Ferreti detectaron *speA* en el 85,0% de pacientes con STSS y en un estudio australiano se observó con una frecuencia del 80,0% en este cuadro clínico (1982-1993) (Carapetis, 1995; Proft, 2007). Sin embargo, en un estudio de Hsueh y cols. no se encontró ninguna diferencia significativa entre cepas invasivas y no invasivas en Taiwan (Cunningham, 2000; Hsueh, 1998).

En el presente estudio, *speA* se detectó en el 41,3% de SGA aislados de pacientes con SSTS, obteniendo valores más elevados para muestras de fascitis necrotizante (51,2%) e infecciones respiratorias (50,0%). Según nuestro estudio no podemos establecer una clara relación entre *speA* y estos cuadros clínicos, de hecho Sriskandan sugiere que *speA* no es un factor clave de virulencia en fascitis ni bacteriemia y por si solo no aumenta la capacidad invasiva del tejido blando (Sriskandan, 1999).

La escarlatina también ha sido relacionada con la presencia de *speA*, diversos brotes de escarlatina se han asociado con un incremento en la frecuencia de clones de SGA con *speA2* y *speA3* (Bianco, 2006; Cunningham, 2000; Mascini, 2000; Tyler, 1992). En nuestro caso sólo en el 22,8 % de las cepas productoras de escarlatina fue detectado *speA*.

El 58,1 % y 56,5% de los aislados de fascitis necrotizante y síndrome de shock tóxico, presentaron el gen *speJ* frente a porcentajes menores para el resto de los cuadros clínicos. Por tanto, *speJ* podría desempeñar un papel importante en fascitis necrotizante y STSS, sugerencia previamente descrita por Proft y cols (Proft, 2001).

smeZ es el superatígeno bacteriano más potente descrito hasta el momento y constituye el estímulo más importante de *S. pyogenes* en la producción de citoquinas (Maripuu, 2008; Unnikrishnan, 2002). Se ha demostrado su alto potencial de virulencia en STSS, tanto estudios *in vitro* como *in vivo* (Vlaminckx, 2003).

Entre las cepas españolas esta implicación se hace evidente, el 69,6 % de SGA aislados de SSTS presentaron *smeZ*. En casos de fascitis necrotizante (53,5%) e infecciones respiratorias (66,7%) también parece estar fuertemente implicado.

ssa parece ser importante en casos de escarlatina (58,7%) e infecciones óseas, (50,0%), sin embargo, en la bibliografía analizada no se han encontrado datos que

apoyen esta sugerencia.

En casos de celulitis e infecciones de piel, *speC* está presente en el 77,1% de SGA, pudiendo sugerir importancia en este cuadro clínico. En otros estudios este gen se ha relacionado con escarlatina y SSTs para los que no se han encontrado datos significativos (Mascini, 2000; Proft, 2001).

En fascitis necrotizante, autores como Vlamincx no han descrito posibles genes de toxinas asociados al cuadro clínico, en nuestro caso sugerimos una posible implicación de *speA*, *speJ* y *smeZ* (Vlamincx, 2003).

Al analizar la representación de los genes de toxinas obtenidos en cada uno de los serotipos de SGA se obtuvieron resultados más interesantes.

La mayoría de los serotipos de cepas españolas presentaron *speG* en el 100,0% de sus cepas, excepto *emm4T4* y *emm77T28*, cuya representación fue de tan sólo un 4,9% y 14,3% respectivamente. Esta ausencia de *speG* en *emm4* ha sido previamente descrita, en el caso de *emm77T28* no se encontraron descripciones (Commons, 2008; Vlamincx, 2003).

speA fue detectado con elevada frecuencia en los serotipos *emm1T1*, *emm3TNT*, *emm3T3* y *emm3T3/13*, contrariamente presentaron *speC* con muy baja frecuencia. La asociación de *speA* con *emm1* y *emm3* ha sido previamente descrita en numerosos estudios (Beres, 2002; Koh, 2006; McMillan, 2006; Schmitz, 2003; Vlamincx, 2003, 2007; Wahl, 2007b), en cuanto a la presencia de *speC* la discrepancia es mayor. En diversos estudios en China, *speC* fue detectado en el 66,7% e incluso en el 97,7% de SGA *emm1*, sin embargo, en otras descripciones *emm1* y *emm3* presentan escasez de *speC* (Creti, 2007; McMillan, 2006; Schmitz, 2003; Vlamincx, 2003). Estos últimos datos son los que encontramos en nuestro estudio, con valores de un 5,0%-14,3% en los cuatro serotipos (Creti, 2007; Liang, 2008; Luca-Harari, 2008b; Ma, 2009; Maripuu, 2008; Schmitz, 2003; Stathi, 2008; Szczypa, 2006; Wahl, 2007b). Estos datos implican una asociación de la toxina *speA* con *emm1T1* y *emm3T(3-3/13-NT)*, serotipos altamente implicados en enfermedades invasivas.

speJ parece estar implicado en la virulencia de *emm1T1* (79,8%), *emm28T28* (74,7%) y *emm44T5/27/44* (69,2%), debido a la elevada frecuencia de aparición en estos serotipos. La elevada frecuencia de *speJ* en *emm1* ha sido previamente descrita (Commons, 2008; Maripuu, 2008; McMillan, 2006), al igual que para *emm28*

(McMillan, 2006; Schmitz, 2003), sin embargo, para *emm44T5/27/44* no se han encontrado este tipo de descripciones.

El gen *speH* se asoció con *emm12T12* y *emm75T25*. En varios estudios europeos se observó *speH* en todas o la mayoría de las cepas *emm12* (Luca-Harari, 2008b; McMillan, 2006; Schmitz, 2003; Vlamincx, 2003), sin embargo, en cuanto a la relación con *emm75* no hemos encontrado datos.

smeZ predominó en tres serotipos: *emm4T4*, *emm1T1* y *emm87T28*. La elevada presencia de *smeZ* en *emm1* ha sido descrita por varios autores, del mismo modo que para *emm4* (Maripuu, 2008; Schmitz, 2003; Vlamincx, 2003).

ssa se ha descrito como destacado en cepas con serotipo *emm3* (McMillan, 2006; Schmitz, 2003; Vlamincx, 2003), de hecho entre las cepas españolas se ha observado en el 93,0% de las cepas *emm3*. De modo que el gen *ssa* aparece claramente asociado con este serotipo.

En 2002, tras secuenciar el genoma *emm3* se observó la adquisición de un profago (Φ 315.2) portador de *ssa*. La adquisición de este profago parecen presentarla las cepas más actuales, en nuestro caso el 93,0% de las cepas *emm3* presentaron *ssa*, planteando la posibilidad de que hayan adquirido este profago (Beres, 2002).

En *emm4T4* y *emm44T5/27/44* el gen *ssa* también fue identificado con elevada frecuencia, en el 90,1 % y 92,3% respectivamente, indicando una posible asociación con estos serotipos. En trabajos previos se observó la presencia de este gen en el serotipo *emm4* (Vlamincx, 2003).

speI podría asociarse con *emm12T12* y *emm75T25*, serotipos en los que aparece con más frecuencia este gen. En un estudio de microarrays descrito por McMillan y cols. se observa que el 100,0% de las cepas *emm12* poseen *speI* (McMillan, 2006).

En 2003 Schmitz y cols. realizaron un estudio de 239 cepas invasivas de SGA procedentes de 12 países europeos (Programa SENTRY) entre ellos España, analizando los perfiles de toxinas. Identificaron 15 perfiles de toxinas frecuentes (> 2%), a continuación mostramos 10 de ellos: ABFGJZ (14,0%), ABFGssa (9,9%), ABFGZ (8,9%), BFG (7,2%), BCFGJ (6,2%), BCFG (5,5%), ABFG (5,1%), BCFGH (4,5%), ABFGHssa (2,8%), BFGH (2,8%), ABCFGssa (2,1%), ABFGJssa (2,1%), BCFGssa (2,1%), BFGJ (2,1%), BFGZ (2,1%). Lo más destacable con respecto a nuestro estudio

fue que todos los perfiles se identificaron entre las cepas españolas excepto dos de ellos: ABFG y ABFGHssa.

Si consideramos como Schmitz los perfiles presentes en más de un 2% de las cepas como los más frecuentes, definimos 11 perfiles: BCFG (15,5%), ABFGJZ (7,3%), BCFZssa (5,5%), BCFGJ (5,0%), ABFGssa (4,7%), BFGssa (4,4%), BCFGHI (4,1%) y BFGHI (3,7%), BCG (3,4%), BCF (2,2) y BFG (2,2). 4 de estos perfiles no fueron identificados como más frecuentes por Schmitz: BCFZssa, BFGssa, BCG y BCF (Schmitz, 2003). Estos perfiles presentaron especial importancia en nuestras cepas ya que ocuparon el tercer, sexto, noveno y décimo puesto de frecuencia de perfiles de genes toxigénicos, respectivamente.

Los perfiles ABFGZ y BFG descritos por Schmitz en tercer y cuarto lugar, en nuestro caso no son muy frecuentes, sólo fueron identificados en el 1,7% y 2,2% de las cepas estudiadas. En las cepas españolas el perfil destacado fue BCFG con un 15,5% frente al 5,5% de Schmitz.

En cuanto a los perfiles de toxinas presentes en cada uno de los serotipos, en varios estudios se ha sugerido que las cepas *emm1* de SGA poseen los genes *speA*, *speG*, *speJ* y *smeZ* mientras que no poseen *speC*, *ssa* ni *speH* (Aguero, 2008; Beres, 2002; Chatellier, 2000). En nuestro estudio podemos corroborar estos datos, ya que el 43,0% de *emm1*T1 presentaron el perfil de toxinas ABFGJZ, segundo perfil más frecuente entre cepas españolas de SGA. Este perfil sólo lo presentaron cepas *emm1*T1 exceptuando una cepa *emm87*T28, de modo que está claramente asociado con *emm1*T1. Esta asociación del perfil ABFGJZ también se observa en el estudio realizado por Schmitz y cols. (Schmitz, 2003). Se observa ausencia de *speC*, *ssa* y *speH*, ya que sólo el 7,0%, 6,1% y 4,4% de *emm1*T1 los poseen.

Los perfiles BCFZssa (n=38), BCZssa (n=11) y BFGssa (n=10), que se encuentran entre los 17 perfiles de toxinas más frecuentes, se asociaron con *emm4*T4. El 100,0% de las cepas BCZssa y BFGssa fueron *emm4*T4, al igual que el 97,4% de BCFZssa. En un trabajo de Vlamincx, se observa el predominio de BCFGZssa en *emm4* (Vlamincx, 2003).

El 100,0% y 94,1% de las cepas cuyos perfiles fueron BCGJ y BCFGJ, respectivamente, se asociaron con el serotipo *emm28*T28, indicando una posible asociación entre este serotipo y los perfiles de toxinas. El predominio de BCFGJ en *emm28* se observa en los datos obtenidos por Vlamincx (Vlamincx, 2003).

El 93,8% de las cepas con perfil ABFGssa fueron *emm3*, mientras que el 100,0% de BFGHI fueron *emm12*, concretamente *emm12T12* (96,0 %) y *emm12TNT* (4,0%). Del mismo modo que en los casos anteriores podría indicar una asociación entre estos perfiles de toxinas y serotipos. De hecho el predominio de ABFGssa en *emm3* ha sido previamente observado (Schmitz, 2003), al igual que el predominio de BFGH en *emm12* en un trabajo realizado por Vlaminckx y cols. en el cual no se analizó *speI* (Vlaminckx, 2003).

No se observó una asociación entre cuadro clínico y el perfil de toxinas, lo que indica que el perfil toxigénico depende del serotipo y no del cuadro clínico producido.

6. Sensibilidad de las cepas a los antibióticos empleados en el tratamiento de las infecciones producidas por SGA

La sensibilidad de *Streptococcus pyogenes* frente a penicilina es completa y ha permanecido invariable durante los últimos años. Este hecho es casi único dentro del género *Streptococcus* y otros microorganismos gram positivos (Horn, 1998; Freeman, 2002). Diversos estudios indican que la sensibilidad *in vitro* de SGA a penicilina no se ha modificado en los últimos 80 años y desde nuestro conocimiento siguen sin describirse cepas de SGA resistentes a este antibiótico (Albrich, 2004; Gonzalo de Liria, 2004; Nielsen, 2004).

Las cepas de SGA estudiadas procedieron de casi todas las Comunidades Autónomas y fueron sensibles a vancomicina. Sin embargo, se observó que el 32,8% de SGA mostraron resistencia a eritromicina y un 6,5% a clindamicina.

En España, se han descrito previamente valores de resistencia global a macrólidos del 20,0-30,0% (Ardanuy, 2005; Morosini, 2003; Perez-Trallero, 2001, 2007; Tamayo, 2005). Observándose tasas más bajas (10,0-16,0%) en el norte de España (Santander, San Sebastián, Bilbao, Guipúzcoa) y valores de incluso un 60,0% en el sur, concretamente en Córdoba (Gordillo, 2003; Perez-Trallero, 2001).

Este incremento en los niveles de resistencia a macrólidos en SGA fue documentado en la literatura a partir de 1980, llegándose a considerar un problema

clínico en muchos países del mundo (Biedenbach, 2003; Cornaglia, 1999; Leclercq, 2002; Mascini, 2000; Seppala, 1998; Uh, 2007).

En Europa las tasas de resistencia descritas varían entre 0,0%- 47,0%, mostrando niveles bajos de resistencia los países del norte (0-4%) frente a los países mediterráneos como Italia (38,9%), Francia (22,4%), Grecia (23,0%), Portugal (26,6%) y en nuestro caso España (32,8%) (Bingen, 2004; Giumarra, 2008; Pangalis, 2008; Silva-Costa, 2005).

En el continente americano la resistencia a macrólidos fue de 5,6% y 12,9%, en EEUU y Canadá respectivamente (Tanz, 2008). Estos valores de resistencia llegan a ser superados en algunas regiones del mundo como China (97,0%) (YaolingMa, 2008), donde casi todos sus aislados son resistentes a macrólidos. Estos datos contrastan sorprendentemente con los de otros países asiáticos como Israel (1,8%) e Irán (0,2%) que prácticamente no presentan resistencia a este antibiótico (Jasir, 2000; Nir-Paz, 2006).

En cuanto a la susceptibilidad a tetraciclina, el 6,8 % de las cepas estudiadas fueron resistentes. La información disponible para este antibiótico fue menor que para macrólidos.

En general la resistencia a tetraciclina en España es más baja que la descrita en otros países. Los principales estudios españoles provienen de Madrid, mostrando valores de resistencia de 7,3 % (1992-1999) y 13,1% (1994-2001) (Betriu, 2004; Orden, 1996). En contraste con nuestros datos, en 2006 se describe una tasa de resistencia a tetraciclina del 25,4% en Barcelona (Rivera, 2006).

Como se ha comentado anteriormene, la resistencia a tetraciclina fue más elevada en otros países, como se observa en Corea (19,0%), Israel (23,6%), Japón (26,7%), Dinarmarca (33,7%), Portugal (38,7%), Irán (42,0%) o China (94,1%) (Hammerum, 2004; Jasir, 2000; Matsumoto, 2005; Nir-Paz, 2006; Silva-Costa, 2005; Uh, 2007; YaolingMa, 2008).

7. Resistencia a macrólidos

Como se ha comentado anteriormente la resistencia a eritromicina entre las cepas estudiadas fue elevada, observándose un 32,8% de resistencia. Los serotipos con porcentajes representativos de resistencia a eritromicina fueron: *emm75T25* (93,5%), *emm4T4* (84,7%), *emm11T11* (50%), *emm28T28* (50%), *emm6T6* (43,3%) y *emm12T12* (29,4%). Estos serotipos se han asociado con resistencia a eritromicina en numerosos trabajos de diferentes áreas geográficas, variando su distribución en función de la localización. El serotipo *emm84T25* no presentó un número representativo de cepas, no obstante, destacar que las seis cepas detectadas en nuestro estudio fueron resistentes a eritromicina. En la bibliografía analizada no se han observado descripciones que asocien *emm84T25* con resistencia a eritromicina.

emm28 y *emm4* han sido considerados como los serotipos resistentes a macrólidos más prevalentes en Europa según el proyecto Strep-EURO (Luca, 2008). Por otro lado, el serotipo *emm12* es el principal responsable de resistencia en numerosos países: Alemania, Grecia, Italia, Portugal, Israel, China o Corea, en este último desplazado a partir de 2004 por *emm44/61* (Dicuonzo 2002; Ho, 2003; Koh, 2008; Nir-Paz; 2006; Reinert, 2004a; Silva-Costa, 2005). En Estados Unidos, *emm12* es el segundo serotipo responsable de la resistencia a eritromicina, superado sólo por *emm75* (Green, 2006; Richter, 2005; Tanz, 2004).

emm6 se ha asociado con resistencia a eritromicina pero no es de los serotipos más representativos en el mundo. Entre 2000-2001 se describió un brote en una escuela de Penilvania, asociado con un clon resistente *emm6* (Martin, 2002).

Desde nuestro conocimiento todos los serotipos mencionados excepto *emm6T6* y *emm84T25* han sido descritos como clones resistentes a macrólidos circulantes en España (Alberti, 2003; Perez-Trallero, 1999, 2007). Pérez-Trallero y cols. describieron 4 clones mayoritarios entre 1988-1997 relacionados con el fenotipo M: 2 clones *emm4T4*, 1 clon *emm12T12* y *emm75T8.25* (Perez-Trallero, 1999). En otro trabajo posterior (1999-2005), se describen otros cuatro clones relacionados con el fenotipo MLS_B: 1 clon *emm11T11*, 2 subclones *emm28T28*, 1 clon *emm22T12* y 1 clon *emm77T28* (Perez-Trallero, 2007).

En nuestro estudio, los serotipos *emm4T4*, *emm75T25* y *emm12T12* se asociaron con resistencia a macrólidos y refractariedad a *Sma*-I, ya que el 84,7%, 93,5% y 76,0%

respectivamente, no fueron digeribles con *Sma*-I. Esta refractariedad del serotipo T4 ha sido previamente descrita en Italia (Valisena, 1999).

El clon *emm4T4 Sfi1*(n=79) fue mayoritario en nuestro estudio, corresponde visualmente con el clon B descrito por Pérez-Trallero, indicando que este clon resistente a macrólidos continúa circulando en España. El perfil *Sfi2 emm4T4* (n=13) mostró un 88,9% de similitud con *Sfi1*, indicando la estrecha relación genética entre los mismos. Este clon B también fue identificado en Finlandia, Grecia, Italia, Inglaterra y Suecia, mostrando así una amplia distribución (Kataja, 2002).

El clon C *emm4T4* identificado previamente en España, Reino Unido y Estado Unidos (Kataja, 2002) no se detectó en nuestras cepas, aunque podría relacionarse con *Sfi4* (n=2) y *Sfi5* (n=2), que entre sí presentan una similitud de 80,0%.

En *emm75T25* se identifican dos clones claramente asociados con resistencia a eritromicina, uno mayoritario que es *Sfi12* (n=41) y otro minoritario que es *Sfi13* (n=2). El clon *Sfi12* es idéntico al clon D, exceptuando una banda adicional situada entre 48,5 y 97 kb.

Parece que en España también hay otros clones asociados con resistencia a eritromicina, *emm6T6 Sfi17* y *emm84T25 Sfi22*, que no hemos encontrado entre la bibliografía.

El clonE *emm1T1* también asociado con resistencia a macrólidos, continúa circulando en España ya que podemos relacionarlo con nuestros pulsotipos *Sfi18* y *Sfi19*.

En el caso del serotipo *emm28T28* no se observó una asociación tan clara entre pulsotipo y resistencia a eritromicina. Todas las cepas fueron digeribles con *Sma*I excepto una. Los patrones *Sma51a* y *Sma51b* podrían asociarse con resistencia a eritromicina ya que el 94,0% y 73,0% de las cepas *emm28T28* que presentaron estos perfiles fueron resistentes a este antibiótico.

8. Caracterización fenotípica y molecular de los mecanismos de resistencia a macrólidos

Se detectaron los tres fenotipos de resistencia a macrólidos analizados entre las cepas españolas. El fenotipo M (76,9%) fue el predominante, seguido por los fenotipos MLS_bc (20,3%) y MLS_bi (2,7%).

Las bombas de expulsión activa (fenotipo M) son uno de los mecanismos más frecuentes en la resistencia a macrólidos (Zhong, 2000). En España continúa siendo el mecanismo mayoritario al presentarlo el 76,9 % de las cepas resistentes a eritromicina estudiadas. Este mecanismo de resistencia se ha descrito como predominante en diversos estudios españoles, alcanzando valores de hasta 95,6% en un estudio multicéntrico realizado en 1998 por Alos y cols. (Alos, 2000, 2003; Ardanuy, 2005; Betriu, 1999; Merino, 2008; Montes, 2006; Oliver, 2007; Perez-Trallero, 1999, 2001, 2005, 2007; Portillo, 2000, 2003; Rivera, 2006; Tamayo, 2005). El fenotipo M también predomina en países como Alemania, Argentina, Bélgica, Finlandia, Grecia, Estados Unidos y Canadá, entre otros (Green, 2006; Littauer, 2006; Michos, 2009; Morosini, 2003; Petropoulou, 2008; Reinert, 2004a, 2004b; Tanz, 2008; Zachariadou, 2003).

El gen *mef*(A/E) ha sido descrito como el principal responsable del fenotipo M (Leclercq, 2002; Mensa, 2003; Perez-Trallero, 2007; Sutcliffe, 1996). Este gen se detectó en todas las cepas españolas con fenotipo M exceptuando 3 de ellas. En una de las cepas no se detectó ninguno de los genes estudiados, sin embargo, en las dos restantes se observó *msr*(D) solo y en combinación con *erm*(TR).

En diversos estudios de resistencia a macrólidos de SGA el gen *msr*(D) ha sido detectado junto con *mef*(A/E) (Amezaga, 2006; Daly, 2004; Luthje, 2007). *mef*(A/E) y *msr*(D) se encuentran en un mismo elemento genético y se cotranscriben juntos, sugiriendo que las proteínas codificadas pueden actuar como un sistema de flujo dual (Varaldo, 2009). Sin embargo, también se ha sugerido que *msr*(D) es capaz de funcionar independientemente de *mef*(A/E) (Amezaga, 2006; Daly, 2004; Varaldo, 2009). Desde nuestro conocimiento la capacidad de actuación de *msr*(D) de modo independiente sólo se ha descrito en células clonadas (Daly, 2004). En nuestro caso, parece que en las dos últimas cepas descritas, el gen *msr*(D) puede ser el responsable del fenotipo M.

El fenotipo MLS_bc se observó en el 20,3% de SGA españolas. Se ha descrito como predominante en Europa en el proyecto Strep-EURO 2003-2004 (Luca, 2008). Otros autores han descrito este predominio en países del este y centro Europa como Hungría, Eslovaquia, Polonia y República Checa (Gracia, 2009). En China, se han observado valores del 90,1% en pacientes pediátricos (YaolingMa, 2008).

A partir de 2003, MLS_bc ha sido desplazado por el fenotipo M en algunos países como Italia (Creti, 2007) y Portugal (Silva-Costa, 2005). En Finlandia se ha observado algo similar, el 40,0% de los SGA presentaron el fenotipo M en 1990, incrementándose hasta un 80,0% en 1994 (Kataja, 1999). También se ha observado un aumento del fenotipo M en Hungría, República Checa y Polonia (Gracia, 2009), de modo que MLS_bc, en un principio predominante, está siendo desplazado por el fenotipo M.

erm(B), principal responsable de este fenotipo MLS_bc (Michos, 2009; Perez-Trallero, 2007; Woo, 2003) ha sido identificado en todas las cepas españolas de SGA MLS_bc, exceptuando 3 de ellas. En dos cepas no se consiguió amplificar ninguno de los cuatro genes de resistencia a macrólidos estudiados, indicando que la resistencia podría estar producida por otro tipo de genes de resistencia no estudiados. En la cepa restante se identificaron *erm*(TR)+ *mef*(A/E), en este caso el gen *erm*(TR) parece ser el responsable de este fenotipo MLS_bc. En estudios previos, se han identificado mutaciones en la región reguladora de *erm*(TR), desencadenantes de la expresión constitutiva (Kataja, 1999, 2000; Leclercq, 2002; Malhotra-Kumar, 2009).

El fenotipo MLS_bi fue minoritario entre las cepas españolas de SGA (2,7%) mientras que en países como Noruega (75,0%) y Bulgaria (57,7%) fue predominante (Littauer, 2006). En Grecia, Alemania y Estados Unidos, a pesar de predominar el fenotipo M, es el segundo fenotipo más frecuente con amplia diferencia con respecto a MLS_bc (Green, 2006; Littauer, 2006; Michos, 2009; Reinert, 2004b; Zachariadou, 2003). En contraste con los datos anteriores Richter y cols. describieron MLS_bi (47,3%) como predominante en Estados Unidos entre 2002-2003 (Richter, 2005). En Grecia, MLS_bi (76,0%) se describe como predominante en SGA aislados de niños en 2007 (Panagea, 2008).

Todas las cepas españolas MLS_bi presentaron el gen *erm*(TR), asociación previamente descrita en la literatura (Amezaga, 2006; Kataja, 1999; Michos, 2009; Perez-Trallero, 2007; Seppala, 1998). *erm*(TR), domina en Polonia, Bulgaria y Canadá

en contraste con España, Bélgica, Grecia, Argentina y Finlandia, en donde prevalece el fenotipo M (Littauer, 2006)

Entre las cepas españolas de SGA se detectaron hasta 14 combinaciones diferentes de los cuatro genes de resistencia a macrólidos estudiados: *erm*(B), *erm*(TR), *mef*(A/E) y *msr*(D).

La cantidad de genotipos descritos en otros estudios son menores, posiblemente porque en muchos de los trabajos realizados no se ha estudiado la presencia o ausencia de *msr*(D). *msr*(D) es un gen relativamente nuevo que presenta similitud con *msr*(A) de *Staphylococcus* spp. (Ojo, 2006) y se ha estudiado en algunos trabajos más recientes.

La combinación *mef*(A/E) y *msr*(D) fue mayoritaria en las cepas de SGA españolas (38,0%), todas presentaron el fenotipo M como se ha descrito en la literatura. (Varaldo, 2009). *mef*(A/E) + *msr*(D) + *erm*(TR) fue la segunda combinación más frecuente (19,7%), al igual que en el caso anterior todas las cepas presentaron el fenotipo M a pesar de presentar *erm*(TR).

La tercera combinación más frecuente fue *erm*(B)+ *msr*(D) + *mef*(A/E) (11,2%), en este caso 25 cepas presentaron fenotipo M y las 8 cepas restantes MLS_B.

El 9,2% de SGA resistentes a macrólidos presentaron los cuatro genes de resistencia estudiados: *erm*(B)+ *erm*(TR)+ *msr*(D)+ *mef*(A/E). La mayoría de estas cepas presentaron fenotipo M, excepto 2 MLS_Bc y 2 MLS_Bi.

Un mismo genotipo puede producir fenotipos diferentes, desconocemos los motivos de estas diferencias, de modo que la correlación genotipo-fenotipo continúa estando lejos de nuestro entendimiento (Leclercq, 2002).

En cuanto a la representación de determinados genes de resistencia en serotipos concretos, el gen *erm*(B) destacó en *emm11T11* y *emm28T28*, como ha sido previamente descrito en España (Montes, 2006; Rivera, 2006). Algunas combinaciones de genes destacaron en determinados serotipos, así *msr*(D)+*mef*(A/E) predominó en *emm1T1* (60,0%), *emm4T4* (53,4%), *emm6T6* (89,7%) y *emm12T12* (50,0%). En el caso de *emm4T4* también destacó *msr*(D)+ *mef*(A/E) +*erm*(TR) (31,0%). En *emm75T25* *msr*(D)+ *mef*(A/E) +*erm*(TR)(39,5%) y *erm*(B) + *msr*(D)+ *mef*(A/E) +*erm*(TR) (32,6%) fueron las más destacadas.

Entre las cepas españolas resistentes a eritromicina la amplia mayoría (73,2%) no fueron digeribles con *Sma*I, presentaron el fenotipo M y fueron sensibles a

tetraciclina. No se observó esta refractariedad para las cepas resistentes a tetraciclina ni para las que presentaron resistencia conjunta a eritromicina+tetraciclina. En los 898 SGA estudiados sólo se observó una cepa refractaria a *SmaI* que no fue resistente a eritromicina, de modo que esta característica podría asociarse con resistencia a macrólidos.

Esta característica ha sido previamente descrita y se ha relacionado con la presencia de profagos que confieren resistencia a macrólidos mediante el fenotipo M. Estos profagos codifican una metiltransferasa responsable de la modificación de la diana sobre la que actúa *SmaI*, impidiendo así la digestión del ADN (Figueiredo, 2006).

El 97,7% de las cepas refractarias a *SmaI* presentaron los genes *msr(D)* +*mef(A/E)*. Se ha sugerido que los genes *mef(A/E)* y *msr(D)* pueden estar contenidos en un transposon 1207.1, el cual se inserta en un elemento genético mayor como puede ser *Tn1207.3* o el elemento quimérico de 58,8 kb, ambos flanqueados por el gen *comEC* (Bacciaglia, 2007; Brenciani, 2004; Figueiredo, 2006).

9. Resistencia a tetraciclina

Como se ha comentado previamente el 6,8% de SGA estudiados fueron resistentes a tetraciclina. El 100,0% (n=27) de las cepas *emm77T28* presentaron resistencia a este antibiótico. Otros serotipos asociados con una cierta resistencia a tetraciclina fueron *emm60T28* (80%) y *emm11T11* (50%). Algunos de los serotipos mayoritarios en nuestro estudio mostraron cifras muy discretas de resistencia a tetraciclina: *emm1T1* (0,8%), *emm6T6* (3,0%), *emm28T28* (2,6%), *emm12T12* (1,5%). Sin embargo, en Irán o Japón, *emm1*, *emm6*, *emm12*, *emm4* y *emm11* fueron los serotipos más comunes entre las cepas resistentes a tetraciclina (Jasir, 2000). Es significativo el hecho de que en alguno de los serotipos predominantes en el estudio no se haya encontrado resistencia a tetraciclina (*emm3*, 4, 75, 2).

Como se ha comentado se observó una asociación entre *emm77T28* y la resistencia a tetraciclina. *emm77* ha sido previamente asociado con resistencia a tetraciclina en Israel y en el proyecto Strep-EURO (Luca, 2008; Nir-Paz, 2006). En Italia y Noruega, se han detectado clones *emm77 (erm(TR)+tet(O))* fenotipo MLS_b i con resistencia conjunta a macrólidos y tetraciclina (Palmieri, 2006). Entre las cepas de

nuestro estudio sólo se observaron dos cepas *emm77T28* resistentes a macrólidos y tetraciclina, cuyos genotipos son diferentes a los descritos por Palmieri y cols.

10. Caracterización molecular de los mecanismos de resistencia a tetraciclina

En cuanto a los genes de resistencia asociados con tetraciclina, el 42,6 % de las cepas resistentes mostraron la combinación *tet(M)* + *tet(O)*, frente a un 39,3% para *tet(M)*. *tet(M)* + *tet(O)* no suele predominar entre las cepas de *S. pyogenes* resistentes a tetraciclina, siendo *tet(M)* el principal determinante de resistencia en numerosos estudios con valores del 77,2%, 91,9% y 74,2% en países como Suecia, Israel y Dinamarca respectivamente (Hammerum, 2004; Jasir, 2001; Littauer, 2006; Nir-Paz, 2006; Villedieu, 2003). Así en un estudio realizado por Ayer y cols., con 244 cepas procedentes de más de 20 países, *tet(M)* se detectó en el 88,0% de las cepas resistentes a tetraciclina mientras que *tet(M)* + *tet(O)* no se observó en ninguna de las cepas del estudio (Ayer, 2007). Sin embargo, en algunos estudios italianos se describen valores importantes de *tet(M)* + *tet(O)* entre las cepas resistentes a tetraciclina, describiendo valores del 94,4% en un trabajo realizado por Giummarra y cols. (Borbone, 2008; Giummarra, 2008).

Entre los estudios españoles no se han encontrado descripciones en las que domine *tet(M)* + *tet(O)*. El gen más prevalente fue *tet(M)* seguido de *tet(O)*, en alguna ocasión se describe alguna cepa con la presencia simultánea de los dos genes (Betriu, 2002, 2004; Perez-Trallero, 2007; Rivera, 2006).

Todas las cepas resistentes a tetraciclina fueron digeribles con *Sma*I. Los pulsotipos *Sma*10a *emm77T28* y *Sma*64 *emm11T11* podrían asociarse con resistencia a tetraciclina, ya que el 100,0% de las cepas fueron resistentes a este antibiótico. En *emm77T28* *Sma*10b también se observó cierta asociación, ya que el 94,1% fueron resistentes a tetraciclina.

11. Resistencia conjunta a eritromicina y tetraciclina

Se observó que el 2,1% de las cepas estudiadas fueron resistentes a macrólidos y tetraciclina. La representación de esta co-resistencia en los diferentes serotipos observados (tabla 62) fue baja, exceptuando *emm11T11* que destacó por presentar el 45,8% (n=11) de sus cepas resistencia a eritromicina y tetraciclina. Este serotipo se ha asociado previamente con co-resistencia (Jasir, 2000; Perez-Trallero, 2007), describiéndose como un clon (*erm*(B) + *tet*(M)) prevalente en cepas españolas MLS_b (Perez-Trallero, 2007). En nuestro caso encontramos cuatro cepas con este genotipo, las cuales no podemos concluir si pertenecen al clon descrito previamente. Las 7 cepas restantes presentaron genotipos variados. Recientemente se ha descrito en Francia un brote familiar multiresistente debido a este serotipo (Martinaud, 2009).

Todas las cepas corresistentes fueron digeribles con *Sma*-PFGE, destacando el pulsotipo *emm11T11 Sma*-64 que sólo fue detectado en este tipo de SGA, indicando una posible asociación entre pulsotipo y co-resistencia.

En cuanto al fenotipo observado, todos los SGA estudiados presentaron el fenotipo MLS_bc excepto uno que fue MLS_bi. En Atenas o Noruega también se observa un predominio de MLS_b en cepas corresistentes (Littauer, 2006; Michos, 2009). Ninguna de las cepas españolas con fenotipo M presentó resistencia a tetraciclina, hecho observado previamente en Finlandia (Kataja, 1999). Sin embargo, se han descrito cepas con resistencia conjunta y fenotipo M en otros estudios (Giovanetti, 1999; Kataja, 2000).

En un trabajo realizado por Kataja y cols. se estudiaron 298 cepas procedentes de varios países (España, Italia, Inglaterra, Grecia, Argentina, Suecia, USA, Bulgaria). Se observó que el 20% de las cepas con fenotipo M presentaron además resistencia a tetraciclina. La mayoría de estos aislados procedieron de Italia, los 4 restantes procedieron de España y Argentina (Kataja, 2000).

Por otro lado, se ha descrito un 69,5% de cepas con fenotipo M y resistencia a tetraciclina en Italia (Kataja, 2002). También, hay descripciones de cepas MLS_bi asociadas con corresistencia en Finlandia, mostrando valores de hasta un 93,0% (Kataja, 1999).

Como se ha descrito previamente los determinantes de resistencia a tetraciclina estuvieron genéticamente más unidos a genes *erm* que a *mef*(A/E) (Littauer, 2006;

Nielsen, 2004). Entre las cepas resistentes a ambos antibióticos (n=19), 5 de ellas presentaron *tet*(M) y *erm*(B) como únicos determinantes de resistencia, este hecho nos hace sospechar que nuestros aislados podrían llevar inserto el transposon conjugativo de la familia *Tn916* descrito por Brenciani y cols. en el que *erm*(B) y *tet*(M) están unidos (Brenciani, 2007; Martel, 2005).

En todos los aislados restantes excepto en uno (n=13) se detectaron *erm*(B) y *tet*(M) asociados con otros genes de resistencia, así que es posible que lleven otros elementos genéticos diferentes.

La combinación *mef*(A) y *tet*(O) ha sido previamente descrita (Bacciaglia, 2007; Giovanetti, 2003; Roberts, 2005), sin embargo, en nuestro estudio *mef* (A/E) (n=8) siempre apareció asociado con otro gen de resistencia a macrólidos y con *tet*(M) o *tet*(M)+*tet*(O), pero no lo encontramos asociado con *tet*(O) como único determinante de resistencia a tetraciclina.

Lo mismo ocurre con la combinación *erm*(TR) y *tet*(O) (Giovanetti, 2003), que fue detectada en 2 cepas junto con *tet*(M) y otros genes de resistencia a macrólidos.

Numerosos elementos genéticos se han relacionado con la resistencia a eritromicina, muchos de ellos asociados con resistencia a tetraciclina, sería interesante realizar estudios posteriores para determinar estos elementos en las cepas españolas. En *S. pyogenes* se han descrito diversos elementos genéticos como Tn917, Tn3872, Tn6002 (todos llevan como determinantes de resistencia *erm*(B) y *tet*(M)), Tn1116 (*erm*(B)), ICE10750-RD.2 (*erm*(TR)), pRW35 (*erm*(T)), Tn1207.1/Tn1207.3, Φ10394.4 (*mef*(A) y *msr*(D)) y Φm46.1. (*mef*(A) y *msr*(D) y *tet*(O)) (Varaldo, 2009).

12. Resistencia a rifampicina

El tratamiento habitual de la infección pos SGA no incluye la administración de rifampicina. Se utiliza en casos de fallo terapéutico tras la administración de penicilina oral en la erradicación de infecciones del tracto respiratorio en niños, portadores faríngeos crónicos y como quimioprofilaxis para los contactos de brotes ocasionados por infecciones de *S. pyogenes* (Herrera, 2002). Los mecanismos implicados en la resistencia a rifampicina en *S. pyogenes* casi no han sido investigados, existiendo pocas descripciones sobre la susceptibilidad de SGA frente a rifampicina.

La resistencia en gram positivos se debe a mutaciones en la subunidad β de la ARN polimerasa codificada por el gen *rpoB* (Aubry-Damon, 2002). Estas mutaciones se localizan generalmente de la posición nucleotídica 486 a 717 (numeración de *E. coli*), correspondiente a la región central del gen *rpoB*.

Tras analizar la susceptibilidad a rifampicina entre las 898 cepas estudiadas, se observó una resistencia de 0,3% (3 cepas). Dos de estas cepas (*emm22T12* y *emm9T9*) procedieron de niños de una misma familia que habían sido tratados con rifampicina como profilaxis, sugiriendo que la prescripción inadecuada de este antibiótico podría ser la causa de esta resistencia. Estas cepas fueron aisladas en 1997, año en el que la prescripción de rifampicina en Madrid fue muy alta y se usó como profilaxis para meningitis meningocócica en Madrid y otras regiones de España (Herrera, 2002). La otra cepa resistente (*emm58TNT*) fue la única aislada de conjuntivitis en nuestro estudio.

Se identificaron 2 mutaciones diferentes, una sustitución de una serina por una leucina Ser482-Leu (equivalente a Ser522 de *E. coli*) presente en una de las cepas y una sustitución de histidina por asparagina His486-Asn (equivalente a His526 de *E. coli*) que se observó en las dos cepas restantes. Estas dos mutaciones fueron publicadas por nuestro laboratorio en 2002 (Herrera, 2002), en el trabajo no se incluyó la cepa procedente de conjuntivitis. La mutación Ser482-Leu (equivalente a Ser522 de *E. coli*) fue descrita en SGA en 2002 por nuestro laboratorio y Aubry-Damon y cols. (Aubry-Damon, 2002; Herrera, 2002). Estos últimos demostraron que la mutación confería resistencia rifampicina. Este tipo de mutación también ha producido altos niveles de resistencia en *Staphylococcus aureus*, *E.coli*, *Neisseria meningitidis* y *Mycobacterium tuberculosis*.

La mutación His526-Asn (equivalencia de *E. coli*) ha sido identificada en *S. pneumoniae* y *S. aureus* como responsable de bajos niveles de resistencia a rifampicina cuando aparece como única mutación (Enright, 1998; Wichelhaus, 1999). También ha sido identificada en *N. meningitidis* y *M. tuberculosis* (Carter, 1994; Telenti, 1993). En nuestro laboratorio también se describió este tipo de mutación en SGA (Herrera, 2002).

Es importante continuar la vigilancia de la resistencia en SGA, ya que como se ha descrito en otros apartados se observa una emergencia de resistencia a macrólidos. Aunque la rifampicina no suele ser un antibiótico de elección para tratar las infecciones de SGA, se usa como profilaxis y en algunos casos en combinación con otros

antibióticos. En nuestro laboratorio hemos identificado subpoblaciones de SGA resistentes a rifampicina que requieren un estudio exhaustivo, ya que en 2008 identificamos 7 cepas resistentes mientras que en 2009 se han llegado a detectar 23 cepas. En algunas de estas cepas se secuenció el gen *rpoB* identificándose mutaciones diferentes a las descritas en esta tesis, por tanto, sería importante continuar con este estudio para obtener más información acerca del mecanismo de resistencia a rifampicina en *S. pyogenes*.

Tras el análisis de 898 cepas de *S. pyogenes* procedentes de 75 laboratorios hospitalarios y atención primaria, que produjeron un amplio espectro de cuadros clínicos, desde portadores asintomáticos a infecciones graves como shock tóxico o fascitis necrotizante podemos deducir que:

1. Se observa diversidad de genes *emm* (39) en las cepas de *S. pyogenes*. Los 10 genes *emm* más frecuentes fueron responsables del 80,4% de los casos de infección por SGA: *emm4*, *emm1*, *emm28*, *emm3*, *emm12*, *emm6*, *emm87*, *emm75*, *emm2* y *emm77*.

2. Los antígenos T (16) observados fueron menos diversos que en el caso del gen *emm*, sin embargo, la asociación de un tipo T con varios genes *emm* permitió la diferenciación entre cepas con el mismo gen *emm*. T28 fue el antígeno que presentó mayor número de asociaciones con el gen *emm* (*emm28*, 87, 77 y 60).

3. La amplia diversidad de genes *emm* y antígenos T, mostró 48 combinaciones *emm*-T, de las cuales 15 constituyeron el 90% de la población estudiada. *emm4*T4 y *emm1*T1 fueron los predominantes en el estudio, seguidos por *emm28*T28, *emm12*T12 y *emm6*T6. Esta distribución es similar a la de otros países, coincidiendo en el predominio de *emm1*T1 en infecciones invasivas graves, aunque en nuestro caso *emm4*T4 fue mayoritario a costa de los casos de escarlatina, aunque también se observó en infecciones graves.

4. La vacuna multivalente (26 tipos *emm*) en fase de experimentación, no sería adecuada en España porque no cubre algunos de los serotipos frecuentes en nuestro medio, tales como *emm4*, *emm87*, *emm78* ó *emm9*. Así, con la inclusión de *emm4* en la fórmula vacunal el espectro de actuación aumentaría de un 63,0% al 78,3%, si se tuvieran en cuenta los otros tipos señalados se alcanzarían valores de hasta el 90,2%.

5. Ninguna fórmula antigénica (*emm*-T) se asoció con un cuadro clínico determinado, aunque se puede destacar a *emm4*T4 como el principal serotipo responsable de escarlatina, junto con *emm9*T9, *emm44*T5/27/44 y *emm87*T28. *emm1*T1

fue el más frecuente en enfermedades invasivas; *emm28T28* y *emm2T2* en celulitis e infecciones de piel, mientras que *emm75T25* lo fue en faringoamigdalitis.

6. La población de SGA presentó elevada diversidad genética, no obstante, se observó cierta clonalidad en los serotipos *emm1T1*, *emm3T(3-NT-3/13)*, *emm11T11*, *emm77T28* y *emm78T11*. Mientras que en *emm28T28* y *emm87T28* hubo mayor variabilidad. En *emm4T4* se detectó menor variabilidad, con un predominio de dos clones principales.

7. Los genes de toxinas cuya codificación es cromosómica, *speB*, *speF* y *speG*, fueron detectados en la mayoría de las cepas, exceptuando *speG*, prácticamente ausente en *emm4T4* y *emm77T28*. Los genes *speH* y *speI* fueron los menos frecuentes, observándose de manera conjunta en muchas ocasiones. La representación de los otros 5 genes toxigénicos (*speA*, *speC*, *speJ*, *ssa*, *smeZ*) fue variable entre el 21,4% y 57,1%).

8. Se observó una gran variabilidad de perfiles toxigénicos (119), constituyendo los 10 más frecuentes el 53,6%. Determinados genes y perfiles de toxinas se asociaron con serotipos concretos, demostrando que el perfil toxigénico de las cepas depende del serotipo y no del cuadro clínico producido. Los perfiles mostrados a continuación se observaron en los serotipos indicados, ABFGJZ: *emm1T1*; BCFZssa, BCZssa y BFGssa: *emm4T4*; BCFGJ y BCGJ: *emm28T28*; ABFGssa: *emm3T(3-NT-3/13)*; BFGHI: *emm12T12* y *emm12TNT*.

9. Algunos genes de toxinas se pudieron relacionar con cuadros clínicos. Así, *speA*, *speJ* y *smeZ* fueron frecuentes en fascitis necrotizante. *SmeZ* destacó en shock tóxico y neumonía, mientras que *ssa* predominó en escarlatina e infecciones óseas. *speC* fue frecuente en celulitis e infecciones de piel.

10. Determinados genes toxigénicos se detectaron con mayor frecuencia en serotipos concretos. Se observaron elevados porcentajes de *speA* y bajos de *speC* en *emm1T1* y *emm3T(3-NT-3/13)*. La representación de *speJ* fue elevada en *emm1T1*, *emm28T28* y *emm44T5/27/44*. *speH* y *speI* destacaron en *emm12T12* y *emm75T25*.

smeZ se observó más frecuentemente en *emm4T4*, *emm1T1* y *emm87T28* mientras que *ssa* en *emm3*, *emm4T4* y *emm44T5/27/44*.

11. El estudio de sensibilidad a antimicrobianos mostró tasas de resistencia a eritromicina del 32,8% y del 6,8% a tetraciclina.

La resistencia a eritromicina se debió a la prevalencia de algunos clones asociados con la misma: *emm75T25* (93,5%), *emm4T4* (84,7%), *emm28T28* (50,0%), *emm11T11* (50,0%), *emm6T6* (43,3%) y *emm12T12* (29,4%). En *emm4T4*, *emm75T25* y *emm12T12* se observó una refractariedad a *SmaI*, característica de cepas resistentes a macrólidos. El fenotipo M (76,9%) fue el prevalente en las cepas resistentes, de hecho, en las cepas refractarias a *SmaI* fue el único fenotipo observado. MLS_b c (20,3%) fue el segundo más frecuente, frente a MLS_b i (2,7%) que fue minoritario. Los genes de resistencia a macrólidos *mef(A/E)* y *msr(D)* fueron predominantes, así como las combinaciones *mef(A/E)+msr(D)* y *mef(A/E)+msr(D)+erm(TR)*.

12. *emm77T28* (100%) y *emm11T11* (50%) fueron los serotipos que mostraron mayor resistencia a tetraciclina. La combinación de los genes *tet(M)+tet(O)* fue predominante en las cepas resistentes a tetraciclina, frente a *tet(M)* y *tet(O)* por separado.

La resistencia conjunta a tetraciclina y eritromicina fue del 2,1%, asociándose con la misma el serotipo *emm11T11* (45,8%). Todas las cepas corresponsistas presentaron el fenotipo MLS_b y los genes *tet(M)+erm(B)*, solos o asociados con otros genes.

13. En el estudio se detectaron 3 cepas con resistencia a rifampicina, en las que se detectaron dos mutaciones en el gen *rpoB* implicadas en la resistencia, Ser482-Leu (equivalente a Ser522 *E. coli*) y His486-Asn (equivalente a His526 *E. coli*).

En función de los resultados de este estudio nos podemos plantear diversas líneas de trabajo en el futuro: El estudio de los elementos genéticos implicados en la resistencia a eritromicina y tetraciclina, sobre todo en las cepas con fenotipo M con los genes *mef(A/E)* y *msr(D)*. También sería relevante el estudio de otros factores de virulencia implicados en infecciones graves como la proteína inhibidora del

complemento (*sic*), proteína fijadora de fibronectina (*prytF1*), hialuronidasa (*hyl*), así como la distribución de otros genes de toxinas pirogénicas como *speK*, *speL* y *speM*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abe, J., Forrester, J., Nakahara, T., Lafferty, J.A., Kotzin, B.L. y Leung, D.Y. (1991). Selective stimulation of human T cells with streptococcal erythrogenic toxins A and B. *J. Immunol.* 146: 3747-3750.
2. Agüero, J., Ortega-Mendi, M., Eliecer, M., González de Aledo, A., Calvo, J., Viloria, L., Mellado, P., Pelayo, T., Fernández-Rodríguez, A. y Martínez-Martínez, L. (2008). Outbreak of invasive group A streptococcal disease among children attending a day-care center. *Pediatr. Infect. J. Dis.* 27: 602-604.
3. Alberti, S., García-Rey, C., Domínguez, M. A., Aguilar, L., Cercenado, E., Gobernado, M. y García-Perea, A. (2003). Survey of *emm* gene sequences from pharyngeal *Streptococcus pyogenes* isolates collected in Spain and their relationship with erythromycin susceptibility. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2385-2390.
4. Albrich, W. C., Monnet, D. L. y Harbarth, S. (2004). Antibiotic selection pressure and resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. *Emerg. Infect. Dis.* 10: 514-517.
5. Alos, J.I., Aracil, B., Oteo, J., Torres, C. y Gómez-Garcés, J.L. (2000). High prevalence of erythromycin-resistant, clindamycin/miocomycin-susceptible (M phenotype) *Streptococcus pyogenes*: results of a Spanish multicentre study in 1998. Spanish Group for the Study of Infection in the Primary Health Care Setting. *J. Antimicrob. Chemother.* 45: 605-609.
6. Alos, J.I., Aracil, B., Oteo, J. y Gómez-Garcés, J.L. (2003). Significant increase in the prevalence of erythromycin-resistant, clindamycin- and miocomycin-susceptible (M phenotype) *Streptococcus pyogenes* in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 51: 333-337.

7. Alouf, J.E. y Muller-Alouf, H. (2003). Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects. *Int. J. Med. Microbiol.* 292: 429-440.

8. Amezcaga, M.R. y McKenzie, H. (2006). Molecular epidemiology of macrolide resistance in beta-haemolytic streptococci of Lancefield groups A, B, C and G and evidence for a new *mef* element in group G streptococci that carries allelic variants of *mef* and *msr*(D). *J. Antimicrob. Chemother.* 57: 443-449.

9. Arcus, V.L., Proft, T., Sigrell, J.A., Baker, H.M., Fraser, J.D. y Baker, E.N. (2000). Conservation and variation in superantigen structure and activity highlighted by the three-dimensional structures of two new superantigens from *Streptococcus pyogenes*. *J. Mol. Biol.* 299: 157-168.

10. Ardanuy, C., Tubau, F., Linares, J., Dominguez, M.A., Pallares, R. y Martin, R. (2005). Distribution of subclasses *mefA* and *mefE* of the *mefA* gene among clinical isolates of macrolide-resistant (M-phenotype) *Streptococcus pneumoniae*, *viridans* group streptococci, and *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 827-829.

11. Aubry-Damon, H., Galimand, M., Gerbaud, G. y Courvalin, P. (2002). *rpoB* mutation conferring rifampin resistance in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 1571-1573.

12. Ausubel, F.M, Brent, R., Kingston, R.E, Moore, D.D, Seidman, J.G., Smith, J.A. y Struth, L. Current Protocols in molecular biology. (1991). Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, Nueva York, Supplement 13: 241-245.

13. Ayer, V., Tewodros, W., Manoharan, A., Skariah, S., Luo, F. y Bessen, D.E. (2007). Tetracycline resistance in group a streptococci: emergence on a global scale and influence on multiple-drug resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 1865-1868.

14. Aziz, R. K. y Kotb, M. (2008). Rise and persistence of global MIT1 clone of *Streptococcus pyogenes*. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 1511-1517.
15. Bacciaglia, A., Brenciani, A., Varaldo, P.E. y Giovanetti, E. (2007). *SmaI* typeability and tetracycline susceptibility and resistance in *Streptococcus pyogenes* isolates with efflux-mediated erythromycin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 3042-3043.
16. Baker, H.M., Proft, T., Webb, P.D., Arcus, V.L., Fraser, J.D. y Baker, E.N. (2004a). Crystallographic and mutational data show that the streptococcal pyrogenic exotoxin J can use a common binding surface for T-cell receptor binding and dimerization. *J. Biol. Chem.* 279: 38571-38576.
17. Baker, M.D. y Acharya, K.R. (2004b). Superantigens: structure-function relationships. *Int. J. Med. Microbiol.* 293: 529-537.
18. Beneden, C.V., Lynfield, R., Glennen, A., Cieslak, P.R., Gershman, K., Beall, B. y cols. Resistance among invasive group A streptococcal infections, United States, 1999-2006. In: Abstract of the XVII Lancefield international symposium on streptococci and streptococcal diseases, Porto Heli, Grecia, 2008. n° 64, p.159.
19. Beres, S.B., Sylva, G.L., Barbian, K.D., Lei, B., Hoff, J.S., Mammarella, N.D., Liu, M. Y., Smoot, J.C., Porcella, S.F., Parkins, L.D., Campbell, D.S., Smith, T.M., McCormick, J.K., Leung, D.Y., Schlievert, P.M. y Musser, J.M. (2002). Genome sequence of a serotype M3 strain of group A *Streptococcus*: phage-encoded toxins, the high-virulence phenotype, and clone emergence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 10078-10083.
20. Betriu, C., Sanchez, A., Gomez, M., Cruceyra, A. y Picazo, J.J. (1993). Antibiotic susceptibility of group A streptococci: a 6-year follow-up study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 1717-1719.

21. Betriu, C., Casado, M.C., Gomez, M., Sanchez, A., Palau, M.L. y Picazo, J.J. (1999). Incidence of erythromycin resistance in *Streptococcus pyogenes*: a 10-year study. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 33: 255-260.
22. Betriu, C., Culebras, E., Redondo, M., Rodriguez-Avial, I., Gomez, M., Boloix, A. y Picazo, J.J. (2002). Prevalence of macrolide and tetracycline resistance mechanisms in *Streptococcus pyogenes* isolates and in vitro susceptibility to telithromycin. *J. Antimicrob. Chemother.* 50: 436-438.
23. Betriu, C., Culebras, E., Rodriguez-Avial, I., Gomez, M., Sanchez, B. A., y Picazo, J.J. (2004). In vitro activities of tigecycline against erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus agalactiae*: mechanisms of macrolide and tetracycline resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 323-325.
24. Bianco, S., Alice, T., Zucca, M. y Savoia, D. (2006). Survey of phenotypic and genetic features of *Streptococcus pyogenes* strains isolated in Northwest Italy. *Curr. Microbiol.* 52: 33-39.
25. Bidet, P., Courroux, C., Salgueiro, C., Carol, A., Mariani-Kurkdjian, P., Bonacorsi, S. y Bingen, E. (2007). Molecular epidemiology of the *stl* streptococcal invasive locus in group A streptococci causing invasive infections in French children. *J. Clin. Microbiol.* 45: 2002-2004.
26. Biedenbach, D.J., Stephen, J.M. y Jones, R.N. (2003). Antimicrobial susceptibility profile among beta-haemolytic *Streptococcus* spp. collected in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program--North America, 2001. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 46: 291-294.
27. Bingen, E., Leclercq, R., Fitoussi, F., Brahimi, N., Malbruny, B., Deforche, D. y Cohen, R. (2002). Emergence of group A streptococcus strains with different mechanisms of macrolide resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 1199-1203.

28. Bingen, E., Bidet, P., Mihaila-Amrouche, L., Doit, C., Forcet, S., Brahimi, N., Bouvet, A. y Cohen, R. (2004). Emergence of macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* strains in French children. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 3559-3562.
29. Bisno, A.L. y Stevens, D.L. *Streptococcus pyogenes*. In Mandell, G.L, Bennett, J.E y Dolin, R. (Eds). 2362-1379. Principles and practice of infectious diseases. (2005a). Elsevier. Churchill, Livingstone.
30. Bisno, A.L., Rubin, F.A., Cleary, P.P. y Dale, J.B. (2005b). Prospects for a group A streptococcal vaccine: rationale, feasibility, and obstacles--report of a National Institute of Allergy and Infectious Diseases workshop. *Clin. Infect. Dis.* 41: 1150-1156.
31. Borbone, S., Lupo, A., Mezzatesta, M.L., Campanile, F., Santagati, M. y Stefani, S. (2008). Evaluation of the in vitro activity of tigecycline against multiresistant Gram-positive cocci containing tetracycline resistance determinants. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 31: 209-215.
32. Bordes-Benitez, A., Sanchez-Onoro, M., Suarez-Bordon, P., Garcia-Rojas, A.J., Saez-Nieto, J.A., Gonzalez-Garcia, A., Alamo-Antunez, I., Sanchez-Maroto, A. y Bolanos-Rivero, M. (2006). Outbreak of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* infections on the island of Gran Canaria associated with the consumption of inadequately pasteurized cheese. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 25: 242-246.
33. Bozdogan, B., Appelbaum, P.C., Ednie, L., Grivea, I. N. y Syrogiannopoulos, G. A. (2003). Development of macrolide resistance by ribosomal protein L4 mutation in *Streptococcus pyogenes* during miocamycin treatment of an eight-year-old Greek child with tonsillopharyngitis. *Clin. Microbiol. Infect.* 9: 966-969.
34. Bremon, A.R., Ruiz-Tovar, M., Gorricho, B.P., de Torres, P.D. y Rodriguez, R. L. (2000). Non-hospital consumption of antibiotics in Spain: 1987-1997. *J. Antimicrob. Chemother.* 45: 395-400.

35. Brenciani, A., Ojo, K.K., Monachetti, A., Menzo, S., Roberts, M.C., Varaldo, P. E. y Giovanetti, E. (2004). Distribution and molecular analysis of *mef(A)*-containing elements in tetracycline-susceptible and -resistant *Streptococcus pyogenes* clinical isolates with efflux-mediated erythromycin resistance. J. Antimicrob. Chemother. 54: 991-998.
36. Brenciani, A., Bacciaglia, A., Vecchi, M., Vitali, L.A., Varaldo, P.E. y Giovanetti, E. (2007). Genetic elements carrying *erm(B)* in *Streptococcus pyogenes* and association with *tet(M)* tetracycline resistance gene. Antimicrob. Agents Chemother. 51: 1209-1216.
37. Carapetis, J.R., Steer, A.C., Mulholland, E.K. y Weber, M. (2005). The global burden of group A streptococcal diseases. Lancet Infect. Dis. 5: 685-694.
38. Carter, P.E., Abadi, F.J., Yakubu, D.E., y Pennington, T.H. (1994). Molecular characterization of rifampin-resistant *Neisseria meningitidis*. Antimicrob. Agents Chemother. 38: 1256-1261.
39. Cartwright, K. (1997). Group A streptococcal infections in humans. J. Appl. Microbiol. Symp. Supplement. 26: 52S-61S.
40. Castells, C. y Arriola, L. Enfermedad invasiva por *Streptococcus pyogenes*. Bol. Epidem. País Vasco. (2007). 21: 4-5.
41. Celestin, R., Brown, J., Kihiczak, G., y Schwartz, R.A. (2007). Erysipelas: a common potentially dangerous infection. Acta Dermatovenerol. Alp. Panonica. Adriat. 16: 123-127.
42. Chatellier, S., Ihendyane, N., Kansal, R.G., Khambaty, F., Basma, H., Norrby-Teglund, A., Low, D.E., McGeer, A. y Kotb, M. (2000). Genetic relatedness and superantigen expression in group A streptococcus serotype M1 isolates from patients with severe and nonsevere invasive diseases. Infect. Immun. 68: 3523-3534.

43. Chiang-Ni, C. y Wu, J.J. (2008). Effects of streptococcal pyrogenic exotoxin B on pathogenesis of *Streptococcus pyogenes*. J. Formos. Med. Assoc. 107: 677-685.
44. Chiou, C.S., Liao, T.L., Wang, T.H., Chang, H.L., Liao, J.C. y Li, C.C. (2004). Epidemiology and molecular characterization of *Streptococcus pyogenes* recovered from scarlet fever patients in central Taiwan from 1996 to 1999. J. Clin. Microbiol. 42: 3998-4006.
45. Chiou, C.S., Wang, Y.W., Chen, P.L., Wang, W.L., Wu, P.F. y Wei, H.L. (2009). Association of the shuffling of *Streptococcus pyogenes* clones and the fluctuation of scarlet fever cases between 2000 and 2006 in central Taiwan. BMC Microbiol. 9: 115.
46. Chopra, I. y Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65: 232-260.
47. Claesson, B.E., Svensson, N.G., Gotthardsson, L., Gotthardsson, L. y Garden, B. (1992). A foodborne outbreak of group A streptococcal disease at a birthday party. Scand. J. Infect. Dis. 24: 577-586.
48. Clinical and Laboratory Standard Institute. (2005). Document M100-S15. Vol.25 n°1. CLSI. Wayne, Pa.
49. Cohen-Poradosu, R. y Kasper, D.L. (2007). Group A streptococcus epidemiology and vaccine implications. Clin. Infect. Dis. 45: 863-865.
50. Commons, R., Rogers, S., Gooding, T., Danchin, M., Carapetis, J., Robins-Browne, R. y Curtis, N. (2008). Superantigen genes in group A streptococcal isolates and their relationship with emm types. J. Med. Microbiol. 57: 1238-1246.

51. Connell, S.R., Tracz, D.M., Nierhaus, K.H. y Taylor, D.E. (2003). Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 3675-3681.
52. Cornaglia, G. (1999). Macrolide resistance and *Streptococcus pyogenes*: Molecular basis, epidemiology and clinical significance. *Reviews in Medical Microbiology.* 10: 245-258.
53. Creti, R., Imperi, M., Baldassarri, L., Pataracchia, M., Recchia, S., Alfarone, G. y Orefici, G. (2007). *emm* Types, virulence factors, and antibiotic resistance of invasive *Streptococcus pyogenes* isolates from Italy: What has changed in 11 years? *J. Clin. Microbiol.* 45: 2249-2256.
54. Cunningham, M.W. (2000). Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 470-511.
55. Czarkowski, M.P. y Kondej, B. (2008). Scarlet fever in Poland in 2006. *Przegl. Epidemiol.* 62: 247-252.
56. Daly, M.M., Doktor, S., Flamm, R. y Shortridge, D. (2004). Characterization and prevalence of *mefA*, *mefE*, and the associated *msr(D)* gene in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 42: 3570-3574.
57. Dámaso, D. Tetraciclinas y anfenícoles. *Antimicrobianos en medicina.* (2006). García, J.A., García, J.E., Gobernado, M., Picazo, J.J. y Prieto, J. 237-251. Sociedad Española de Quimioterapia. Prous Science. Barcelona, España.
58. Darenberg, J., Luca-Harari, B., Jasir, A., Sandgren, A., Pettersson, H., Schalen, C., Norgren, M., Romanus, V., Norrby-Teglund, A. y Normark, B.H. (2007). Molecular and clinical characteristics of invasive group A streptococcal infection in Sweden. *Clin. Infect. Dis.* 45: 450-458.

59. Davey, P.G., Bax, R.P., Newey, J., Reeves, D., Rutherford, D., Slack, R., Warren, R.E., Watt, B. y Wilson, J. (1996). Growth in the use of antibiotics in the community in England and Scotland in 1980-93. *BMJ*. 312: 613.
60. De Marzi, M.C., Fernandez, M.M., Sundberg, E.J., Molinero, L., Zwirner, N. W., Llera, A.S., Mariuzza, R.A. y Malchiodi, E.L. (2004). Cloning, expression and interaction of human T-cell receptors with the bacterial superantigen SSA. *Eur. J. Biochem*. 271: 4075-4083.
61. Depardieu, F., Podglajen, I., Leclercq, R., Collatz, E. y Courvalin, P. (2007). Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin. Microbiol. Rev.* 20: 79-114.
62. Dicuonzo, G., Fiscarelli, E., Gherardi, G., Lorino, G., Battistoni, F., Landi, S., De Cesaris, M., Petitti, T. y Beall, B. (2002). Erythromycin-resistant pharyngeal isolates of *Streptococcus pyogenes* recovered in Italy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 3987-3990.
63. Doloy, A., Bidet, P., Lepoutre, A., Collobert, G., Poyart, C., Bingen, E. y Bouvet, A. Microbiological characteristics of invasive *Streptococcus pyogenes* strains in France in 2007. In: Abstract of the XVII Lancefield international symposium on streptococci and streptococcal diseases, Porto Heli, Grecia, 2008. n° 19, p.110.
64. Duncan, S.R., Scott, S., y Duncan, C.J. (2000). Modelling the dynamics of scarlet fever epidemics in the 19th century. *Eur. J. Epidemiol.* 16: 619-626.
65. Efstratiou, A. (1997). Pyogenic streptococci of Lancefield groups C and G as pathogens in man. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* 26: 72S-79S.
66. Efstratiou, A. (2000). Group A streptococci in the 1990s. *J. Antimicrob. Chemother.* 45 Suppl: 3-12.

67. Enright, M., Zawadski, P., Pickerill, P. y Dowson, C. G. (1998). Molecular evolution of rifampicin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Microb. Drug Resist. 4: 65-70.
68. Erdem, G., Matsuura, G., Wheelen, C, Mizumoto, C., Esaki, D. y Effler, P.V. *emm* typing of invasive GAS isolates in Hawaii: 2005-2007 In: Abstract of the XVII Lancefield international symposium on streptococci and streptococcal diseases, Porto Heli, Grecia, 2008. nº 25, p.116.
69. Eriksson, A., Eriksson, B., Holm, S.E. y Norgren, M. (1999). Streptococcal DNase B is immunologically identical to superantigen SpeF but involves separate domains. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 6: 133-136.
70. Espinosa, L.E., Li, Z., Gomez, Barreto D., Calderon, Jaimes E., Rodriguez, R. S., Sakota, V., Facklam, R.R., y Beall, B. (2003). M protein gene type distribution among group A streptococcal clinical isolates recovered in Mexico City, Mexico, from 1991 to 2000, and Durango, Mexico, from 1998 to 1999: overlap with type distribution within the United States. J. Clin. Microbiol. 41: 373-378.
71. Facklam, R., Beall, B., Efstratiou, A., Fischetti, V., Johnson, D., Kaplan, E., Kriz, P., Lovgren, M., Martin, D., Schwartz, B., Totolian, A., Bessen, D., Hollingshead, S., Rubin, F., Scott, J. y Tyrrell, G. (1999). *emm* typing and validation of provisional M types for group A streptococci. Emerg. Infect. Dis. 5: 247-253.
72. Facklam, R. (2002a). What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. Clin. Microbiol. Rev. 15: 613-630.
73. Facklam, R.F., Martin, D.R., Lovgren, M., Johnson, D.R., Efstratiou, A., Thompson, T.A., Gowan, S., Kriz, P., Tyrrell, G.J., Kaplan, E. y Beall, B. (2002b). Extension of the Lancefield classification for group A streptococci by addition of 22 new M protein gene sequence types from clinical isolates: *emm*103 to *emm*124. Clin. Infect. Dis. 34: 28-38.

74. Feeney, K.T., Dowse, G.K., Keil, A.D., Mackaay, C. y McLellan, D. (2005). Epidemiological features and control of an outbreak of scarlet fever in a Perth primary school. *Commun. Dis. Intell.* 29: 386-390.
75. Fiebelkorn, K.R., Crawford, S.A., McElmeel, M.L. y Jorgensen, J. H. (2003). Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4740-4744.
76. Figueiredo, T.A., Aguiar, S.I., Melo-Cristino, J. y Ramirez, M. (2006). DNA methylase activity as a marker for the presence of a family of phage-like elements conferring efflux-mediated macrolide resistance in streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 3689-3694.
77. Fischetti, V.A. (1989). Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior. *Clin. Microbiol. Rev.* 2: 285-314.
78. Fleischer, B., Gerlach, D., Fuhrmann, A. y Schmidt, K.H. (1995). Superantigens and pseudosuperantigens of gram-positive cocci. *Med. Microbiol. Immunol.* 184: 1-8.
79. Freeman, A.F. y Shulman, S.T. (2002). Macrolide resistance in group A *Streptococcus*. *Pediatr. Infect. Dis J.* 21: 1158-1160.
80. Gaworzewska, E. y Colman, G. (1988). Changes in the pattern of infection caused by *Streptococcus pyogenes*. *Epidemiol. Infect.* 100: 257-269.
81. Gerber, M. y Markowitz, M.A. (1993) Faringitis estreptocócica: aclarando las controversias. *Contemporary Pediatrics.* 3: 141-148.
82. Gerber, M. Estreptococo grupo A. Fiebre reumática. Behrman, R.E., Kliegman, R.M. y Jenson, H.B. (Eds). 870-879. *Tratado de pediatría.* (2006). Elsevier. Madrid, España.

83. Giner, E., Salazar, A., Chover, J.L., Roig, J., Llacer, I., Borrás, R., Bosque, M., Farga, A., Guiral, S. y Carbo, R. Brotes de Escarlatina en población escolar. Bol. Epidem. Sem. (2004). 12:37-44.
84. Giovanetti, E., Montanari, M.P., Mingoia, M. y Varaldo, P.E. (1999). Phenotypes and genotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* strains in Italy and heterogeneity of inducibly resistant strains. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 1935-1940.
85. Giovanetti, E., Brenciani, A., Lupidi, R., Roberts, M.C. y Varaldo, P.E. (2003). Presence of the *tet(O)* gene in erythromycin- and tetracycline-resistant strains of *Streptococcus pyogenes* and linkage with either the *mef(A)* or the *erm(A)* gene. Antimicrob. Agents Chemother. 47: 2844-2849.
86. Giumarra, V., Ferranti, C., Scuderi, M.C., Tempera, G., Roccasalva, L.S. y Furneri, P.M. Molecular characterisation of invasive *Streptococcus pyogenes* isolates from South-Italy. In: Abstract of the XVII Lancefield international symposium on streptococci and streptococcal diseases, Porto Heli, Grecia, 2008. nº 75, p.170.
87. Gonzalo de Liria, C.R. (2004). What is the importance of bacterial eradication in the treatment of respiratory tract infections?. An. Pediatr. (Barc). 60: 459-467.
88. Gordillo, R.M., Lacasa, M.J., Ibarra, A., Rodríguez, F. y Casal, M. (2003). Susceptibility of *Streptococcus pyogenes* isolates from pharyngeal exudates in Cordoba (Spain). Rev. Esp. Quimioter. 16: 58-60.
89. Gracia, M., Díaz, C., Coronel, P., Gimeno, M., García-Rodas, R., Rodríguez-Cerrato, V., del Prado, G., Huelves, L., Ruiz, V., Naves, P.F., Ponte, M.C., Granizo, J. J. y Soriano, F. (2009). Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pyogenes* in Central, Eastern, and Baltic European Countries, 2005 to 2006: the cefditoren surveillance program. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 64: 52-56.

90. Granizo, J.J., Aguilar, L., Casal, J., Dal-Re, R. y Baquero, F. (2000). *Streptococcus pyogenes* resistance to erythromycin in relation to macrolide consumption in Spain (1986-1997). J. Antimicrob. Chemother. 46: 959-964.
91. Green, N.M., Zhang, S., Porcella, S.F., Nagiec, M.J., Barbian, K.D., Beres, S. B., LeFebvre, R.B. y Musser, J.M. (2005). Genome sequence of a serotype M28 strain of group A *Streptococcus*: potential new insights into puerperal sepsis and bacterial disease specificity. J. Infect. Dis. 192: 760-770.
92. Green, M.D., Beall, B., Marcon, M.J., Allen, C.H., Bradley, J.S., Dashefsky, B., Gilsdorf, J.R., Schutze, G.E., Smith, C., Walter, E.B., Martin, J.M., Edwards, K.M., Barbadora, K.A. y Wald, E.R. (2006). Multicentre surveillance of the prevalence and molecular epidemiology of macrolide resistance among pharyngeal isolates of group A streptococci in the USA. J. Antimicrob. Chemother. 57: 1240-1243.
93. Hammerum, A.M., Nielsen, H.U., Agerso, Y., Ekelund, K. y Frimodt-Moller, N. (2004). Detection of *tet(M)*, *tet(O)* and *tet(S)* in tetracycline/ minocycline-resistant *Streptococcus pyogenes* bacteraemia isolates. J. Antimicrob. Chemother. 53: 118-119.
94. Hello, S.L, Doloy, A., Roques, N., Baumann, F., Collobert, G., Coudéne, P., Lacassin, F. y Bouvet, A. Diversity of *Streptococcus pyogenes* strains from invasive infections in New Caledonia. In: Abstract of the XVII Lancefield international symposium on streptococci and streptococcal diseases, Porto Heli, Grecia, 2008. nº 20, p.111.
95. Herrera, L., Salcedo, C., Orden, B., Herranz, B., Martinez, R., Efstratiou, A. y Saez-Nieto, J. A. (2002). Rifampin resistance in *Streptococcus pyogenes*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 21: 411-413.

96. Ho, P.L., Johnson, D.R., Yue, A.W., Tsang, D.N., Que, T.L., Beall, B. y Kaplan, E.L. (2003). Epidemiologic analysis of invasive and noninvasive group A streptococcal isolates in Hong Kong. *J. Clin. Microbiol.* 41: 937-942.
97. Hoebe, C.J., Wagenvoort, J.H. y Schellekens, J.F. (2000). An outbreak of scarlet fever, impetigo and pharyngitis caused by the same *Streptococcus pyogenes* type T4M4 in a primary school. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 144: 2148-2152.
98. Horn, D.L., Zabriskie, J.B., Austrian, R., Cleary, P.P., Ferretti, J.J., Fischetti, V. A., Gotschlich, E., Kaplan, E.L., McCarty, M., Opal, S.M., Roberts, R.B., Tomasz, A. y Wachtfogel, Y. (1998). Why have group A streptococci remained susceptible to penicillin? Report on a symposium. *Clin. Infect. Dis.* 26: 1341-1345.
99. Hsueh, P.R., Wu, J.J., Tsai, P.J., Liu, J.W., Chuang, Y.C. y Luh, K.T. (1998). Invasive group A streptococcal disease in Taiwan is not associated with the presence of streptococcal pyrogenic exotoxin genes. *Clin. Infect. Dis.* 26: 584-589.
100. Hu, M.C., Walls, M.A., Stroop, S.D., Reddish, M.A., Beall, B. y Dale, J.B. (2002). Immunogenicity of a 26-valent group A streptococcal vaccine. *Infect. Immun.* 70: 2171-2177.
101. Hunter, P.R. y Gaston, M.A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26: 2465-2466.
102. Imöhl, M., Lütticken, R. y Reinert, R.R. Epidemiology of invasive *S. pyogenes* disease in Germany. In: Abstract of the XVII Lancefield international symposium on streptococci and streptococcal diseases, Porto Heli, Grecia, 2008. nº 45c, p.139.
103. Jasir, A., Tanna, A., Noorani, A., Mirsalehian, A., Efstratiou, A. y Schalen, C. (2000). High rate of tetracycline resistance in *Streptococcus pyogenes* in Iran: an epidemiological study. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2103-2107.

104. Jasir, A., Tanna, A., Efstratiou, A. y Schalen, C. (2001). Unusual occurrence of M type 77, antibiotic-resistant group A streptococci in southern Sweden. *J. Clin. Microbiol.* 39: 586-590.
105. Johnson, D.R., Kaplan, E.L., VanGheem, A., Facklam, R.R. y Beall, B. (2006). Characterization of group A streptococci (*Streptococcus pyogenes*): correlation of M-protein and emm-gene type with T-protein agglutination pattern and serum opacity factor. *J. Med. Microbiol.* 55: 157-164.
106. Jones, K.F., Schneewind, O., Koomey, J.M. y Fischetti, V.A. (1991). Genetic diversity among the T-protein genes of group A streptococci. *Mol. Microbiol.* 5: 2947-2952.
107. Jordan, H.T., Richards, C.L., Burton, D.C., Thigpen, M.C. y Van Beneden, C.A. (2007). Group A streptococcal disease in long-term care facilities: descriptive epidemiology and potential control measures. *Clin. Infect. Dis.* 45: 742-752.
108. Kaplan, E.L., Johnson, D.R. y Cleary, P.P. (1989). Group A streptococcal serotypes isolated from patients and sibling contacts during the resurgence of rheumatic fever in the United States in the mid-1980s. *J. Infect. Dis.* 159: 101-103.
109. Kataja, J., Huovinen, P., Skurnik, M. y Seppala, H. (1999). Erythromycin resistance genes in group A streptococci in Finland. The Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 48-52.
110. Kataja, J., Huovinen, P. y Seppala, H. (2000). Erythromycin resistance genes in group A streptococci of different geographical origins. The Macrolide Resistance Study Group. *J. Antimicrob. Chemother.* 46: 789-792.
111. Kataja, J., Huovinen, P., Efstratiou, A., Perez-Trallero, E. y Seppala, H. (2002). Clonal relationships among isolates of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* of different geographical origin. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21: 589-595.

112. Katz, K.C., McGeer, A.J., Duncan, C.L., Ashi-Sulaiman, A., Willey, B.M., Sarabia, A., McCann, J., Pong-Porter, S., Rzayev, Y., de Azavedo, J. S y Low, D.E. (2003). Emergence of macrolide resistance in throat culture isolates of group A streptococci in Ontario, Canada, in 2001. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 2370-2372.
113. Koh, E.H., Lee, N.Y., Kim, E.C. y Kim, S. (2006). Genetic diversity and exotoxin A production of group A streptococci causing sepsis. *J. Korean Med. Sci.* 21: 193-198.
114. Koh, E.H., Kim, S. y Lee, N.Y. (2008). Decrease of erythromycin resistance in group A streptococci by change of *emm* distribution. *Jpn. J. Infect. Dis.* 61: 261-263.
115. Koliou, M., Ioannou, Y., Efstratiou, A., Hannidou, N., Pieri, V., Alexandrou, M. y Soteriades, E.S. (2007). Circulating serotypes and antimicrobial sensitivity of *Streptococcus pyogenes* isolates from children in Cyprus. *Clin. Microbiol. Infect.* 13: 645-647.
116. Kotb, M. (1995). Bacterial pyrogenic exotoxins as superantigens. *Clin. Microbiol. Rev.* 8: 411-426.
117. Krucso, B., Gacs, M., Libisch, B., Hunyadi, Z.V., Molnar, K., Fuzi, M. y Paszti, J. (2007). Molecular characterisation of invasive *Streptococcus pyogenes* isolates from Hungary obtained in 2004 and 2005. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26: 807-811.
118. Kuusi, M., Lahti, E., Virolainen, A., Hatakka, M., Vuento, R., Rantala, L., Vuopio-Varkila, J., Seuna, E., Karppelin, M., Hakkinen, M., Takkinen, J., Gindonis, V., Siponen, K. y Huotari, K. (2006). An outbreak of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* associated with consumption of fresh goat cheese. *BMC Infect. Dis.* 6: 36.

119. Lamagni, T.L., Darenberg, J., Luca-Harari, B., Siljander, T., Efstratiou, A., Henriques-Normark, B., Vuopio-Varkila, J., Bouvet, A., Creti, R., Ekelund, K., Koliou, M., Reinert, R.R., Stathi, A., Strakova, L., Ungureanu, V., Schalen, C. y Jasir, A. (2008a). Epidemiology of severe *Streptococcus pyogenes* disease in Europe. J. Clin. Microbiol. 46: 2359-2367.
120. Lamagni, T.L., Neal, S., Keshishian, C., Alhaddad, N., George, R., Duckworth, G., Vuopio-Varkila, J. y Efstratiou, A. (2008b). Severe *Streptococcus pyogenes* infections, United Kingdom, 2003-2004. Emerg. Infect. Dis. 14: 202-209.
121. Leclercq, R. (2002). Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. Clin. Infect. Dis. 34: 482-492.
122. Levy, S.B., McMurry, L.M., Barbosa, T.M., Burdett, V., Courvalin, P., Hillen, W., Roberts, M.C., Rood, J.I. y Taylor, D.E. (1999). Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 1523-1524.
123. Li, Z., Sakota, V., Jackson, D., Franklin, A.R. y Beall, B. (2003). Array of M protein gene subtypes in 1064 recent invasive group A streptococcus isolates recovered from the active bacterial core surveillance. J. Infect. Dis. 188: 1587-1592.
124. Liang, Y.M., Shen, X.Z., Huang, G.Y., Wang, C.Q., Shen, Y. y Yang, Y.H. (2008). Characteristics of *Streptococcus pyogenes* strains isolated from Chinese children with scarlet fever. Acta Pediatr. 97: 1681-1685.
125. Lintges, M., Arlt, S., Uciechowski, P., Plumakers, B., Reinert, R.R., Al Lahham, A., Lutticken, R. y Rink, L. (2007). A new closed-tube multiplex real-time PCR to detect eleven superantigens of *Streptococcus pyogenes* identifies a strain without superantigen activity. Int. J. Med. Microbiol. 297: 471-478.

126. Littauer, P., Caugant, D.A., Sangvik, M., Hoiby, E.A., Sundsfjord, A. y Simonsen, G.S. (2006). Macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* in Norway: population structure and resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 1896-1899.
127. Loubinoux, J., Florent, M., Merad, B., Collobert, G. y Bouvet, A. (2004). Epidemiological markers of group A streptococcal infections in France. *Indian J. Med. Res.* 119 Suppl: 152-154.
128. Louie, L., Simor, A.E., Louie, M., McGeer, A. y Low, D.E. (1998). Diagnosis of group A streptococcal necrotizing fasciitis by using PCR to amplify the streptococcal pyrogenic exotoxin B gene. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1769-1771.
129. Luca, B., Ekelund, K., Darenberg, J. , Kaltoft, M.S., Efstratiou, A., Bouvet, A. y cols. Genetic determinants and epidemiology of antibiotic resistance among invasive isolates of *Streptococcus pyogenes* in Europe. In: Abstract of the XVII Lancefield international symposium on streptococci and streptococcal diseases, Porto Heli, Grecia, 2008. nº 69, p.164.
130. Luca-Harari, B., Ekelund, K., van der Linden, M., Staum-Kaltoft, M., Hammerum, A.M. y Jasir, A. (2008a). Clinical and epidemiological aspects of invasive *Streptococcus pyogenes* infections in Denmark during 2003 and 2004. *J. Clin. Microbiol.* 46: 79-86.
131. Luca-Harari, B., Straut, M., Cretoiu, S., Surdeanu, M., Ungureanu, V., van der Linden, M. y Jasir, A. (2008b). Molecular characterization of invasive and non-invasive *Streptococcus pyogenes* isolates from Romania. *J. Med. Microbiol.* 57: 1354-1363.
132. Luca-Harari, B., Darenberg, J., Neal, S., Siljander, T., Strakova, L., Tanna, A., Creti, R., Ekelund, K., Koliou, M., Tassios, P.T., van der Linden, M., Straut, M., Vuopio-Varkila, J., Bouvet, A., Efstratiou, A., Schalen, C., Henriques-Normark, B. y

Jasir, A. (2009). Clinical and microbiological characteristics of severe *Streptococcus pyogenes* disease in Europe. J. Clin. Microbiol. 47: 1155-1165.

133. Luthje, P. y Schwarz, S. (2007). Molecular basis of resistance to macrolides and lincosamides among staphylococci and streptococci from various animal sources collected in the resistance monitoring program BfT-GermVet. Int. J. Antimicrob. Agents. 29: 528-535.

134. Ma, Y., Yang, Y., Huang, M., Wang, Y., Chen, Y., Deng, L., Yu, S., Deng, Q., Zhang, H., Wang, C., Liu, L. y Shen, X. (2009). Characterization of *emm* types and superantigens of *Streptococcus pyogenes* isolates from children during two sampling periods. Epidemiol. Infect. 1-6.

135. Macris, M.H., Hartman, N., Murray, B., Klein, R.F., Roberts, R.B., Kaplan, E. L., Horn, D. y Zabriskie, J.B. (1998). Studies of the continuing susceptibility of group A streptococcal strains to penicillin during eight decades. Pediatr. Infect. Dis. J. 17: 377-381.

136. Malagon, C. (2003). Espectro de las manifestaciones reumáticas de las infecciones estreptocócicas en la edad pediátrica. Rev. Colomb. Reumatol. 10: 92-100.

137. Malbruny, B., Nagai, K., Coquemont, M., Bozdogan, B., Andrasevic, A.T., Hupkova, H., Leclercq, R. y Appelbaum, P.C. (2002). Resistance to macrolides in clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* due to ribosomal mutations. J. Antimicrob. Chemother. 49: 935-939.

138. Malhotra-Kumar, S., Lammens, C., Piessens, J. y Goossens, H. (2005). Multiplex PCR for simultaneous detection of macrolide and tetracycline resistance determinants in streptococci. Antimicrob. Agents Chemother. 49: 4798-4800.

139. Malhotra-Kumar, S., Mazzariol, A., Van Heirstraeten, L., Lammens, C., de Rijk, P., Cornaglia, G. y Goossens, H. (2009). Unusual resistance patterns in macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* harbouring *erm*(A). J. Antimicrob. Chemother. 63: 42-46.
140. Maripuu, L., Eriksson, A. y Norgren, M. (2008). Superantigen gene profile diversity among clinical group A streptococcal isolates. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 54: 236-244.
141. Martel, A., Decostere, A., Leener, E.D., Marien, M., Graef, E.D., Heyndrickx, M., Goossens, H., Lammens, C., Devriese, L.A. y Haesebrouck, F. (2005). Comparison and transferability of the *erm* (B) genes between human and farm animal streptococci. Microb. Drug Resist. 11: 295-302.
142. Martin, J.M., Green, M., Barbadora, K.A. y Wald, E.R. (2002). Erythromycin-resistant group A streptococci in schoolchildren in Pittsburgh. N. Eng. J. Med. 346: 1200-1206.
143. Martinaud, C., Doloy, A., Graffin, B., Gaillard, T., Poyet, R., Mallet, S., Carsuzaa, F., Brisou, P. y Bouvet, A. (2009). A family outbreak due to an *emm*-type 11 multiresistant strain of *Streptococcus pyogenes*. Clin. Microbiol. Infect. (Artículo on line, en prensa)
144. Martynova, A. Epidemiology of invasive and non-invasive streptococcal group A infections. In: Abstract of the XVII Lancefield international symposium on streptococci and streptococcal diseases, Porto Heli, Grecia, 2008. nº 22, p.113.
145. Mascini, E.M., Jansze, M., Schouls, L.M., Fluit, A.C., Verhoef, J. y van Dijk, H. (1999). Invasive and noninvasive group A streptococcal isolates with different *speA* alleles in The Netherlands: genetic relatedness and production of pyrogenic exotoxins A and B. J. Clin. Microbiol. 37: 3469-3474.

146. Mascini, E.M., Verhoef-Verhage, E.A.E. y van Dijk, H. (2000). Invasive group A streptococcal diseases and pyrogenic exotoxins A and B: an update on pathogenesis and management. *Rev. Med. Microbiol.* 11: 135-144.
147. Matsumoto, M., Sakae, K., Ohta, M., Endo, M., Okuno, R., Murayama, S., Hirasawa, K., Suzuki, R., Isobe, J., Tanaka, D., Katsukawa, C., Tamaru, A., Tomita, M., Ogata, K., Yasuoka, T., Ikebe, T. y Watanabe, H. (2005). Molecular mechanisms of high level tetracycline-resistance in group A streptococcal isolates, T serotypes 4 and 11. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 25: 142-147.
148. Mazon, A., Gil-Setas, A., Sota de la Gandara LJ, Vindel, A. y Saez-Nieto, J. A. (2003). Transmission of *Streptococcus pyogenes* causing successive infections in a family. *Clin. Microbiol. Infect.* 9: 554-559.
149. McCaig, L.F. y Hughes, J.M. (1995). Trends in antimicrobial drug prescribing among office-based physicians in the United States. *JAMA.* 273: 214-219.
150. McCormick, J.K., Pragman, A.A., Stolpa, J.C., Leung, D.Y. y Schlievert, P.M. (2001). Functional characterization of streptococcal pyrogenic exotoxin J, a novel superantigen. *Infect. Immun.* 69: 1381-1388.
151. McMillan, D.J., Beiko, R.G., Geffers, R., Buer, J., Schouls, L.M., Vlamincx, B. J., Wannet, W.J., Sriprakash, K.S. y Chhatwal, G.S. (2006). Genes for the majority of group A streptococcal virulence factors and extracellular surface proteins do not confer an increased propensity to cause invasive disease. *Clin. Infect. Dis.* 43: 884-891.
152. McNeil, S.A., Halperin, S.A., Langley, J.M., Smith, B., Warren, A., Sharratt, G. P., Baxendale, D.M., Reddish, M.A., Hu, M.C., Stroop, S.D., Linden, J., Fries, L.F., Vink, P.E. y Dale, J.B. (2005). Safety and immunogenicity of 26-valent group A streptococcus vaccine in healthy adult volunteers. *Clin. Infect. Dis.* 41: 1114-1122.

153. Medina-Gens, L., Bordes-Benitez, A., Saez-Nieto, J. A. y Pena-Lopez, M.J. (2005). Epidemic outbreak of streptococcal toxic shock in the community. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 23: 507-508.
154. Meisal, R., Hoiby, E.A., Aaberge, I.S. y Caugant, D.A. (2008). Sequence type and *emm* type diversity in *Streptococcus pyogenes* isolates causing invasive disease in Norway between 1988 and 2003. *J. Clin. Microbiol.* 46: 2102-2105.
155. Mensa, J., Garcia-Vazquez, E. y Vila, J. (2003). Macrolides, ketolides and streptogramins. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21: 200-207.
156. Merino, Diaz L., Torres Sanchez, M. J. y Aznar, Martin J. (2008). Prevalence and mechanisms of erythromycin and clindamycin resistance in clinical isolates of beta-haemolytic streptococci of Lancefield groups A, B, C and G in Seville, Spain. *Clin. Microbiol. Infect.* 14: 85-87.
157. Michos, A., Bacoula, C., Braoudaki, M., Koutouzi, F., Pangalis, A., Kirikou, H. y Syriopoulou, V.P. Distribution of *emm* types of pediatric group A streptococcal isolates during a 4-years period in Athens, Greece. In: Abstract of the XVII Lancefield international symposium on streptococci and streptococcal diseases, Porto Heli, Grecia, 2008. nº 27, p.118.
158. Michos, A.G., Bakoula, C.G., Braoudaki, M., Koutouzi, F.I., Roma, E.S., Pangalis, A., Nikolopoulou, G., Kirikou, E. y Syriopoulou, V.P. (2009). Macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes*: prevalence, resistance determinants, and *emm* types. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 64: 295-299.
159. Montes, M., Orden, B., Tamayo, E., Alos, J.I. y Perez-Trallero, E. (2006). Characterisation of the main clones of *Streptococcus pyogenes* carrying the *ermA* (subclass TR) gene in Spain. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 28: 408-412.

160. Morosini, M.I., Canton, R., Loza, E., del Campo, R., Almaraz, F. y Baquero, F. (2003). *Streptococcus pyogenes* isolates with characterized macrolide resistance mechanisms in Spain: in vitro activities of telithromycin and cethromycin. J. Antimicrob. Chemother. 52: 50-55.
161. Muller-Alouf, H., Proft, T., Zollner, T.M., Gerlach, D., Champagne, E., Desreumaux, P., Fitting, C., Geoffroy-Fauvet, C., Alouf, J.E. y Cavaillon, J.M. (2001). Pyrogenicity and cytokine-inducing properties of *Streptococcus pyogenes* superantigens: comparative study of streptococcal mitogenic exotoxin Z and pyrogenic exotoxin A. Infect. Immun. 69: 4141-4145.
162. Musser, J.M. (1997). Streptococcal superantigen, mitogenic factor, and pyrogenic exotoxin B expressed by *Streptococcus pyogenes*. Structure and function. Prep. Biochem. Biotechnol. 27: 143-172.
163. Nei, M. y W.H..Li. (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA .76:5269-73.
164. Nielsen, H.U., Hammerum, A.M., Ekelund, K., Bang, D., Pallesen, L.V. y Frimodt-Moller, N. (2004). Tetracycline and macrolide co-resistance in *Streptococcus pyogenes*: co-selection as a reason for increase in macrolide-resistant S. pyogenes? Microb. Drug Resist. 10: 231-238.
165. Nir-Paz, R., Block, C., Shasha, D., Korenman, Z., Gorodnitzky, Z., Jaffe, J., Ron, M., Michael-Gayego, A., Cohen-Poradosu, R., Shapiro, M. y Moses, A. E. (2006). Macrolide, lincosamide and tetracycline susceptibility and emm characterisation of invasive *Streptococcus pyogenes* isolates in Israel. Int. J. Antimicrob. Agents. 28: 313-319.
166. Nguyen, L., Levy, D., Ferroni, A., Gehanno, P. y Berche, P. (1997). Molecular epidemiology of *Streptococcus pyogenes* in an area where acute pharyngotonsillitis is endemic. J. Clin. Microbiol. 35: 2111-2114.

167. O'Brien, K.L., Beall, B., Barrett, N.L., Cieslak, P.R., Reingold, A., Farley, M. M., Danila, R., Zell, E.R., Facklam, R., Schwartz, B. y Schuchat, A. (2002). Epidemiology of invasive group A streptococcus disease in the United States, 1995-1999. *Clin. Infect. Dis.* 35: 268-276.
168. O'Loughlin, R.E., Roberson, A., Cieslak, P.R., Lynfield, R., Gershman, K., Craig, A., Albanese, B.A., Farley, M.M., Barrett, N.L., Spina, N.L., Beall, B., Harrison, L.H., Reingold, A. y Van Beneden, C. (2007). The epidemiology of invasive group A streptococcal infection and potential vaccine implications: United States, 2000-2004. *Clin. Infect. Dis.* 45: 853-862.
169. Ojo, K.K., Striplin, M.J., Ulep, C.C., Close, N.S., Zittle, J., Luis, H., Bernardo, M., Leitao, J. y Roberts, M.C. (2006). *Staphylococcus* efflux *msr(A)* gene characterized in *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, and *Pseudomonas* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 1089-1091.
170. Oliver, M.A., Garcia-Delafuente, C., Cano, M.E., Perez-Hernandez, F., Martinez-Martinez, L. y Alberti, S. (2007). Rapid decrease in the prevalence of macrolide-resistant group A streptococci due to the appearance of two epidemic clones in Cantabria (Spain). *J. Antimicrob. Chemother.* 60: 450-452.
171. Orden, B., Martinez, R., Lopez de los, Mozos A. y Franco, A. (1996). Antibiotic resistance to erythromycin, clindamycin and tetracycline of 573 strains of *Streptococcus pyogenes* (1992-1994). *Enf. Infec. Microbiol. Clin.* 14: 86-89.
172. Palmieri, C., Vecchi, M., Littauer, P., Sundsfjord, A., Varaldo, P. E. y Facinelli, B. (2006). Clonal spread of macrolide- and tetracycline-resistant [*erm(A)* *tet(O)*] *emm77 Streptococcus pyogenes* isolates in Italy and Norway. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 4229-4230.

173. Panagea, T., Ikononopoulos, G., Iliadou, H., Kalimeratzi, K., Makri, A. y Voyatzi, A. Streptococcal group A infections in childhood. In: Abstract of the XVII Lancefield international symposium on streptococci and streptococcal diseases, Porto Heli, Grecia, 2008. nº 76, p.171.
174. Pangalis, A., Stathi, A., Papaparaskevas, J., Zachariadou, L., Avlami, A. y cols. Near-doubling of erythromycin resistance rate and change in the main resistance mechanism among invasive group A streptococci in Greece. Continuous surveillance, 2006-2007. In: Abstract of the XVII Lancefield international symposium on streptococci and streptococcal diseases, Porto Heli, Grecia, 2008. nº 65, p.160.
175. Papageorgiou, A.C. y Acharya, K.R. (2000). Microbial superantigens: from structure to function. Trends Microbiol. 8: 369-375.
176. Perez-Trallero, E., Marimon, J. M., Montes, M., Orden, B. y de Pablos, M. (1999). Clonal differences among erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Spain. Emerg. Infect. Dis. 5: 235-240.
177. Perez-Trallero, E., Fernandez-Mazarrasa, C., Garcia-Rey, C., Bouza, E., Aguilar, L., Garcia-de-Lomas, J. y Baquero, F. (2001). Antimicrobial susceptibilities of 1,684 *Streptococcus pneumoniae* and 2,039 *Streptococcus pyogenes* isolates and their ecological relationships: results of a 1-year (1998-1999) multicenter surveillance study in Spain. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 3334-3340.
178. Perez-Trallero, E. y Iglesias, L. (2003). Tetracyclines, sulfonamides and metronidazole. Enf. Infect. Microbiol. Clin. 21: 520-528.
179. Perez-Trallero, E., Garcia, C., Orden, B., Marimon, J. M. y Montes, M. (2004). Dissemination of *emm28* erythromycin-, clindamycin- and bacitracin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Spain. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 23: 123-126.

180. Perez-Trallero, E., Garcia-de-la-Fuente, C., Garcia-Rey, C., Baquero, F., Aguilar, L., Dal Re, R. y Garcia-de-Lomas, J. (2005). Geographical and ecological analysis of resistance, coresistance, and coupled resistance to antimicrobials in respiratory pathogenic bacteria in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 1965-1972.
181. Perez-Trallero, E., Montes, M., Orden, B., Tamayo, E., Garcia-Arenzana, J.M. y Marimon, J.M. (2007). Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus pyogenes* isolates displaying the MLS_B phenotype of macrolide resistance in Spain, 1999 to 2005. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 1228-1233.
182. Petropoulou, N., Kirikou, H, Ntoumpanaki, M., Tsaprouni, K., Kaminioti, C. y cols. Isolation of *Streptococcus pyogenes* from middle ear aspirates in a greek children's hospital during 2003-2007. MLS_B resistance. In: Abstract of the XVII Lancefield international symposium on streptococci and streptococcal diseases, Porto Heli, Grecia, 2008. nº 79, p.174.
183. Pinho, M.D., Melo-Cristino, J. y Ramirez, M. (2006). Clonal relationships between invasive and noninvasive Lancefield group C and G streptococci and emm-specific differences in invasiveness. *J. Clin. Microbiol.* 44: 841-846.
184. Portillo, A., Lantero, M., Zarazaga, M., Gastañares, M.J., Olarte, I., Undabeitia, E., Ruiz-Larrea, F. y Torres, C. (2000). Resistencia a antibióticos macrólidos-lincosamidas-estreptograminas y mecanismos implicados en cepas clínicas de *Streptococcus* spp. en la Rioja. *Zubía Monográfico.* 12: 11-26.
185. Portillo, A., Gastanares, M.J., Ruiz-Larrea, F. y Torres, C. (2003). Clonal diversity among erythromycin-resistant beta-haemolytic *Streptococcus* isolates in La Rioja, Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 52: 485-488.

186. Proft, T., Arcus, V.L., Handley, V., Baker, E.N. y Fraser, J.D. (2001). Immunological and biochemical characterization of streptococcal pyrogenic exotoxins I and J (SPE-I and SPE-J) from *Streptococcus pyogenes*. J. Immunol. 166: 6711-6719.
187. Proft, T. y Fraser, J.D. (2007). Streptococcal superantigens. Chem. Immunol. Allergy. 93: 1-23.
188. Rago, J.V. y Schlievert, P.M. (1998). Mechanisms of pathogenesis of staphylococcal and streptococcal superantigens. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 225: 81-97.
189. Reinert, R.R., Franken, C., van der Linden, M., Luttkicken, R., Cil, M. y Al Lahham, A. (2004a). Molecular characterisation of macrolide resistance mechanisms of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* isolated in Germany, 2002-2003. Int. J. Antimicrob. Agents. 24: 43-47.
190. Reinert, R.R., Luttkicken, R., Sutcliffe, J.A., Tait-Kamradt, A., Cil, M.Y., Schorn, H.M., Bryskier, A. y Al Lahham, A. (2004b). Clonal relatedness of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* isolates in Germany. Antimicrob. Agents Chemother. 48: 1369-1373.
191. Richter, S.S., Heilmann, K.P., Beekmann, S.E., Miller, N.J., Miller, A.L., Rice, C.L., Doern, C.D., Reid, S.D. y Doern, G.V. (2005). Macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* in the United States, 2002-2003. Clin. Infect. Dis. 41: 599-608.
192. Rivera, A., Rebollo, M., Miro, E., Mateo, M., Navarro, F., Gurgui, M., Mirelis, B. y Coll, P. (2006). Superantigen gene profile, *emm* type and antibiotic resistance genes among group A streptococcal isolates from Barcelona, Spain. J. Med. Microbiol. 55: 1115-1123.

193. Roberts, M.C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L.B., Rood, J. y Seppala, H. (1999). Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 2823-2830.
194. Roberts, M.C. (2002). Resistance to tetracycline, macrolide-lincosamide-streptogramin, trimethoprim, and sulfonamide drug classes. *Mol. Biotechnol.* 20: 261-283.
195. Roberts, M.C. (2005). Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 245: 195-203.
196. Roberts, M.C. (2008). Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 282: 147-159.
197. Rogers, S., Commons, R., Danchin, M.H., Selvaraj, G., Kelpie, L., Curtis, N., Robins-Browne, R. y Carapetis, J.R. (2007). Strain prevalence, rather than innate virulence potential, is the major factor responsible for an increase in serious group A *Streptococcus* infections. *J. Infect. Dis.* 195: 1625-1633.
198. Ross, P.W. (1971). Beta-haemolytic streptococci in the throat: carrier rates in schoolchildren. *Health Bull. (Edinb.)*. 29: 108-112.
199. Ruoff, K.L., Whiley, R.A. y Beighton, D. *Streptococcus*. In Murray, P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Tenover F.C. y Tenover P.C. (Eds). 405-417. *Manual of clinical Microbiology*. (2003). ASM Press. Washington.
200. Sakota, V., Fry, A.M., Lietman, T.M., Facklam, R.R., Li, Z. y Beall, B. (2006). Genetically diverse group A streptococci from children in far-western Nepal share high genetic relatedness with isolates from other countries. *J. Clin. Microbiol.* 44: 2160-2166.

201. Sarangi, J. y Rowsell, R. (1995). A nursing home outbreak of group A streptococcal infection: case control study of environmental contamination. *J. Hosp. Infect.* 30: 162-164.
202. Schmitz, F.J., Beyer, A., Charpentier, E., Normark, B.H., Schade, M., Fluit, A. C., Hafner, D. y Novak, R. (2003). Toxin-gene profile heterogeneity among endemic invasive European group A streptococcal isolates. *J. Infect. Dis.* 188: 1578-1586.
203. Seppala, H., Nissinen, A., Yu, Q. y Huovinen, P. (1993). Three different phenotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Finland. *J. Antimicrob. Chemother.* 32: 885-891.
204. Seppala, H., Skurnik, M., Soini, H., Roberts, M.C. y Huovinen, P. (1998). A novel erythromycin resistance methylase gene (*ermTR*) in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 257-262.
205. Sevilla, P., Martino, R., Carrasco, A., Alonso, M., Blanco, J.E y García, J.E. Escarlatina: una enfermedad actual (revisión de 165 casos). (2003). *Acta Pediatr. Esp.* 61:292-295.
206. Sevillano, D., Alou, L. y Prieto, J. Macrólidos y cetólidos. García, J.A., García, J.E., Gobernado, M., Picazo, J.J. y Prieto, J. 199-215. *Antimicrobianos en medicina.* (2006). Sociedad Española de Quimioterapia. Prous Science. Barcelona, España.
207. Shemesh, E., Fischel, T., Goldstein, N., Alkan, M. y Livneh, A. (1994). An outbreak of foodborne streptococcal throat infection. *Isr. J. Med. Sci.* 30: 275-278.
208. Shulman, S.T., Tanz, R.R., Kabat, W., Kabat, K., Cederlund, E., Patel, D., Li, Z., Sakota, V., Dale, J.B. y Beall, B. (2004). Group A streptococcal pharyngitis serotype surveillance in North America, 2000-2002. *Clin. Infect. Dis.* 39: 325-332.

209. Siljander, T., Toropainen, M., Muotiala, A., Hoe, N.P., Musser, J.M. y Vuopio-Varkila, J. (2006). *emm* typing of invasive T28 group A streptococci, 1995-2004, Finland. J. Med. Microbiol. 55: 1701-1706.
210. Silva-Costa, C., Ramirez, M. y Melo-Cristino, J. (2005). Rapid inversion of the prevalences of macrolide resistance phenotypes paralleled by a diversification of T and emm types among *Streptococcus pyogenes* in Portugal. Antimicrob. Agents Chemother. 49: 2109-2111.
211. Smeesters, P. R., Mardulyn, P., Vergison, A., Leplae, R., y Van Melderren, L. (2008). Genetic diversity of Group A *Streptococcus* M protein: implications for typing and vaccine development. Vaccine. 26: 5835-5842.
212. Sriskandan, S., Unnikrishnan, M., Krausz, T. y Cohen, J. (1999). Molecular analysis of the role of streptococcal pyrogenic Exotoxin A (SPEA) in invasive soft-tissue infection resulting from *Streptococcus pyogenes*. Mol. Microbiol. 33: 778-790.
213. Sriskandan, S., Unnikrishnan, M., Krausz, T. y Cohen, J. (2000). Mitogenic factor (MF) is the major DNase of serotype M89 *Streptococcus pyogenes*. Microbiology. 146: 2785-2792.
214. Sriskandan, S., Faulkner, L. y Hopkins, P. (2007). *Streptococcus pyogenes*: Insight into the function of the streptococcal superantigens. Int. J. Biochem. Cell Biol. 39: 12-19.
215. Stathi, A., Papaparaskevas, J., Zachariadou, L., Pangalis, A., Legakis, N.J., Tseleni-Kotsovili, A., Tassios, P.T. y Hellenic Strep-EURO Study Grp. (2008). Prevalence of *emm* types 1 and 12 from invasive *Streptococcus pyogenes* disease in Greece - results of enhanced surveillance. Clin. Microbiol. Inf. 14: 808-812.
216. Stevens, D.L. (2000). Streptococcal toxic shock syndrome associated with necrotizing fasciitis. Ann. Rev. Med. 51: 271-288.

217. Stollerman, G.H. (1997). Rheumatic fever. *Lancet*. 349: 935-942.
218. Sutcliffe, J., Grebe, T., Tait-Kamradt, A. y Wondrack, L. (1996). Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 2562-2566.
219. Szczypa, K., Sadowy, E., Izdebski, R., Strakova, L. y Hryniewicz, W. (2006). Group A streptococci from invasive-disease episodes in Poland are remarkably divergent at the molecular level. *J. Clin. Microbiol.* 44: 3975-3979.
220. Tamayo, J., Perez-Trallero, E., Gomez-Garces, J.L. y Alos, J.I. (2005). Resistance to macrolides, clindamycin and telithromycin in *Streptococcus pyogenes* isolated in Spain during 2004. *J. Antimicrob. Chemother.* 56: 780-782.
221. Tanz, R.R., Shulman, S.T., Shortridge, V.D., Kabat, W., Kabat, K., Cederlund, E., Rippe, J., Beyer, J., Doktor, S. y Beall, B.W. (2004). Community-based surveillance in the united states of macrolide-resistant pediatric pharyngeal group A streptococci during 3 respiratory disease seasons. *Clin. Infect. Dis.* 39: 1794-1801.
222. Tanz, R.R. , Tanz, R.J., Rippe, J., Kabat, K., Kabat, W., Beall, B., Dale, J.B. y Shulman, S.T. National and local variations in group A streptococcal macrolide resistance in North America over 7 years. In: Abstract of the XVII Lancefield international symposium on streptococci and streptococcal diseases, Porto Heli, Grecia, 2008. n° 70, p.165.
223. Telenti, A., Imboden, P., Marchesi, F., Lowrie, D., Cole, S., Colston, M.J., Matter, L., Schopfer, K. y Bodmer, T. (1993). Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*. 341: 647-650.
224. Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H. y Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction

- patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. 33: 2233-2239.
225. Trojavchich, M.C. Infección estreptocócica y atopia. Arch. Alerg. Inmunol. Clin. (2001) 32: 30-34.
226. Tyler, S.D., Johnson, W.M., Huang, J.C., Ashton, F.E., Wang, G., Low, D.E. y Rozee, K.R. (1992). Streptococcal erythrogenic toxin genes: detection by polymerase chain reaction and association with disease in strains isolated in Canada from 1940 to 1991. J. Clin. Microbiol. 30: 3127-3131.
227. Tyrrell, G.J., Lovgren, M., Forwick, B., Hoe, N.P., Musser, J.M. y Talbot, J.A. (2002). M types of group a streptococcal isolates submitted to the National Centre for *Streptococcus* (Canada) from 1993 to 1999. J. Clin. Microbiol. 40: 4466-4471.
228. Tyrrell, G.J., Lovgren, M., Kress, B. y Grimsrud, K. (2005). Invasive group A streptococcal disease in Alberta, Canada (2000 to 2002). J. Clin. Microbiol. 43: 1678-1683.
229. Tyrell, G., Solomon, N., Low, D., McGeer, A., Bourgault, A.M., Hoang, L., Patrick, D., Horsman, G. y Lovgren, M. A comparison of group A streptococcal M types in Canada: 1993-1999 vs 2000-2006. In: Abstract of the XVII Lancefield international symposium on streptococci and streptococcal diseases, Porto Heli, Grecia, 2008. nº 23 p.114.
230. Uh, Y., Hwang, G.Y., Jang, I.H., Cho, H.M., Noh, S.M., Kim, H.Y., Kwon, O. y Yoon, K.J. (2007). Macrolide resistance trends in beta-hemolytic streptococci in a tertiary Korean hospital. Yonsei Med. J. 48: 773-778.
231. Unnikrishnan, M., Altmann, D.M., Proft, T., Wahid, F., Cohen, J., Fraser, J.D. y Sriskandan, S. (2002). The bacterial superantigen streptococcal mitogenic exotoxin Z

is the major immunoactive agent of *Streptococcus pyogenes*. J. Immunol. 169: 2561-2569.

232. Valdezate, S., Labayru, C., Navarro, A., Mantecon, M.A., Ortega, M., Coque, T. M., Garcia, M. y Saez-Nieto, J.A. (2009). Large clonal outbreak of multidrug-resistant CC17 ST17 *Enterococcus faecium* containing Tn5382 in a Spanish hospital. J. Antimicrob. Chemother. 63: 17-20.

233. Valisena, S., Falci, C., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Cocuzza, C.E., Nicoletti, P., Rescaldani, R. y Fontana, R. (1999). Molecular typing of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* strains with the M phenotype isolated in Italy. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 18: 260-264.

234. Vallalta, Morales M., Soriano Navarro, C.J., Salavert, Lleti M., Montero, Alonso M., Perez, Belles C., Lopez, Aldeguer J., Otero, M. C. y Gobernado, Serrano M. (2006). Group A streptococcal bacteremia: outcome and prognostic factors. Rev. Esp. Quimioter. 19: 367-375.

235. Vallalta-Morales, M., Salavert-Lleti, M., Artero-Mora, A., Mahiques-Santos, L., Solaz-Moreno, E. y Perez-Belles, C. (2005). Streptococcal toxic shock syndrome: ten years' experience at a tertiary hospital. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 23: 540-544.

236. Varaldo, P.E., Montanari, M.P. y Giovanetti, E. (2009). Genetic elements responsible for erythromycin resistance in streptococci. Antimicrob. Agents Chemother. 53: 343-353.

237. Villedieu, A., Diaz-Torres, M.L., Hunt, N., McNab, R., Spratt, D.A., Wilson, M. y Mullany, P. (2003). Prevalence of tetracycline resistance genes in oral bacteria. Antimicrob. Agents Chemother. 47: 878-882.

238. Vlaminckx, B.J., Mascini, E.M., Schellekens, J., Schouls, L.M., Paauw, A., Fluit, A.C., Novak, R., Verhoef, J. y Schmitz, F.J. (2003). Site-specific manifestations

- of invasive group A streptococcal disease: type distribution and corresponding patterns of virulence determinants. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4941-4949.
239. Vlaminckx, B.J., Schuren, F.H., Montijn, R.C., Caspers, M.P., Beitsma, M.M., Wannet, W.J., Schouls, L.M., Verhoef, J. y Jansen, W.T. (2007). Dynamics in prophage content of invasive and noninvasive M1 and M28 *Streptococcus pyogenes* isolates in The Netherlands from 1959 to 1996. *Infect. Immun.* 75: 3673-3679.
240. Vlaminckx, B.J., van Pelt, W., Schouls, L.M., van Silfhout, A., Mascini, E.M., Elzenaar, C.P., Fernandes, T., Bosman, A. y Schellekens, J.F. (2005). Long-term surveillance of invasive group A streptococcal disease in The Netherlands, 1994-2003. *Clin. Microbiol. Infect.* 11: 226-231.
241. Wagenvoort, J.H., Penders, R.J., Davies, B.I. y Lutticken, R. (2005). Similar environmental survival patterns of *Streptococcus pyogenes* strains of different epidemiologic backgrounds and clinical severity. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 24: 65-67.
242. Wahl, R., Lutticken, R., Stanzel, S., van der Linden, M. y Reinert, R. (2007a). Epidemiology of invasive *Streptococcus pyogenes* infections in Germany. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 29: S187-S187.
243. Wahl, R.U., Lutticken, R., Stanzel, S., van der Linden, M. y Reinert, R.R. (2007b). Epidemiology of invasive *Streptococcus pyogenes* infections in Germany, 1996-2002: results from a voluntary laboratory surveillance system. *Clin. Microbiol. Infect.* 13: 1173-1178.
244. Weisblum, B. (1998). Macrolide resistance. *Drug Resist. Updat.* 1: 29-41.
245. Wichelhaus, T.A., Schafer, V., Brade, V. y Boddingtonhaus, B. (1999). Molecular characterization of *rpoB* mutations conferring cross-resistance to rifamycins on

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 2813-2816.

246. Woo, P.C., To, A.P., Tse, H., Lau, S.K. y Yuen, K.Y. (2003). Clinical and molecular epidemiology of erythromycin-resistant beta-hemolytic lancefield group G streptococci causing bacteremia. J. Clin. Microbiol. 41: 5188-5191.

247. YaolingMa, XuzhuangShen y YonghongYang. M protein gene (*emm* type) and drug resistance analysis of Group A Beta-hemolytic streptococci isolated from Chinese pediatrics. In: Abstract of the XVII Lancefield international symposium on streptococci and streptococcal diseases, Porto Heli, Grecia, 2008. nº 72, p.167.

248. Zachariadou, L., Papaparaskevas, J., Paraskakis, I., Efstratiou, A., Pangalis, A., Legakis, N.J. y Tassios, P.T. (2003). Predominance of two M-types among erythromycin-resistant group A Streptococci from Greek children. Clin. Microbiol. Inf. 9: 310-314.

249. Zhong, P. y Shortridge, V.D. (2000). The role of efflux in macrolide resistance. Drug Resist. Updat. 3: 325-329.